

Death Receptor 3 –  
Molekulare Mechanismen der Rezeptoraktivierung  
und der intrazellulären Signaltransduktion



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Sebastian Bittner

aus

Roth

im Jahr 2017

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 24.02.2017

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. André Gessner

Unterschrift:

“By all means let's be open-minded, but not so open-minded that our brains drop out.”

-Richard Dawkins-

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Abstract .....	7
1.1 Zusammenfassung .....	7
1.2 Abstract.....	9
2. Einleitung .....	10
2.1 Die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Superfamilie .....	10
2.1.1 Liganden der TNF Familie.....	10
2.1.2 Rezeptoren der TNF Familie.....	11
2.1.3 Signaltransduktion von Todesrezeptoren.....	12
2.1.4 Todesrezeptor-induzierte Apoptose .....	15
2.1.5 Das nekroptotische Zelltodprogramm.....	16
2.1.6 Die (patho-) physiologische Relevanz von Nekroptose.....	18
2.2 Death Receptor 3 und sein Ligand TL1A.....	19
2.3 Regulatorische T-Zellen: eine exklusive Zellpopulation mit therapeutischem Potenzial .....	21
2.4 Ziel der Arbeit .....	23
3. Material und Methoden .....	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Geräte .....	24
3.1.2 Verbrauchsmaterial .....	25
3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien.....	26
3.1.4 Kits.....	28
3.1.5 Puffer und Lösungen.....	29
3.1.6 Zelllinien .....	30
3.2 Zellbiologische Methoden .....	30
3.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	30
3.2.2 Isolation regulatorischer T-Zellen.....	30
3.2.3 Zellkultur.....	31
3.2.4 Aktivitätsmessung von Caspase-3/7 .....	31
3.2.5 Durchflusszytometrie .....	32
3.2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	33

3.2.7 siRNA Experimente .....	33
3.2.8 Mikroskopie .....	34
3.2.9 Zytotoxizitätsassay .....	34
3.2.10Suppressions-Assay .....	34
3.3 Proteinanalytische Methoden .....	36
3.3.1 Herstellung von Zelllysaten .....	36
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	36
3.3.3 Immunpräzipitation .....	37
3.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	37
3.3.5 Westernblot-Analyse und immunologischer Nachweis von Proteinen.....	38
3.3.6 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Liganden der TNF Familie .....	40
3.3.7 Silberfärbung.....	41
4. Ergebnisse .....	42
4.1 Untersuchungen zur TL1A-vermittelten DR3-Aktivierung .....	42
4.1.1 Produktion und Charakterisierung von löslichem TL1A .....	42
4.1.2 Trimeres TL1A birgt vollständiges Aktivierungspotenzial für DR3 .....	45
4.1.3 Geringe Bindungsaffinität von TL1A zu DR3.....	49
4.2 DR3 initiiert apoptotischen und nekroptotischen Zelltod.....	51
4.2.1 IAP Depletion verstärkt DR3-induzierte Zytotoxizität.....	51
4.2.2 Caspase-unabhängige Zytotoxizität von DR3 .....	54
4.2.3 TL1A induziert die Formation des Nekrosoms .....	58
4.2.4 DR3-vermittelte Nekroptose ist abhängig von HSP90 und RIP3 .....	60
4.2.5 TAK1, ein Regulator DR3-induzierter Nekroptose .....	63
4.2.6 TL1A/DR3-initiierte Nekroptose wird von ROS Produktion begleitet .....	66
4.3 DR3-Signaltransduktion auf regulatorischen T-Zellen .....	69
4.3.1 DR3 Expression auf humanen Tregs .....	69
4.3.2 DR3 aktiviert intrazelluläre Signalwege in Tregs.....	71
4.3.3 DR3-Signaltransduktion fördert die Proliferation von Tregs <i>in vitro</i> .....	73
5. Diskussion .....	76
5.1 Lösliches TL1A ist zur DR3 Aktivierung ausreichend .....	76
5.2 IAP Depletion ermöglicht Zelltod-Induktion durch TL1A/DR3.....	79
5.3 DR3, ein neuer Nekroptose-induzierender Rezeptor der TNF Familie.....	80
5.4 DR3 Expression auf humanen regulatorischen T-Zellen .....	83
6. Literaturverzeichnis.....	86

7. Anhang .....	102
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	102
7.2 Tabellenverzeichnis .....	102
7.3 Abkürzungsverzeichnis .....	103
7.4 Publikationen .....	105
7.5 Auszeichnungen.....	105
7.6 Lebenslauf .....	106
7.7 Danksagung .....	107

# **1. Zusammenfassung / Abstract**

## **1.1 Zusammenfassung**

Der Rezeptor Death Receptor 3 (DR3) ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Familie. DR3 ist in zahlreichen biologischen Prozessen wie Zellproliferation, Entzündung, Immunabwehr und aber auch programmiertem Zelltod involviert. Ursprünglich wurde DR3 als co-stimulierendes Molekül auf T-Zellen beschrieben. Mittlerweile wurde eine Rolle von DR3 bei einer Vielzahl von inflammatorischen (T-Zell-vermittelten) Erkrankungen dokumentiert. In den Fokus der Forschung ist DR3 allerdings v.a. wegen seiner anti-inflammatorischen Funktion gerückt. Durch Stimulation von DR3 können regulatorische T-Zellen (Tregs) *in vivo* selektiv zur Expansion angeregt werden. Diese Strategie konnte in verschiedenen Mausmodellen zur Eindämmung ungewünschter (auto-) immunologischer Reaktionen genutzt werden. Infolgedessen zeichnete sich in den letzten Jahren ein durchaus vielversprechendes therapeutisches Potential für diesen Rezeptor ab, wenngleich nur wenige Untersuchungen zur Funktion von humanem DR3 existieren.

Zur Expression und Funktionalität dieses Rezeptors auf humanen Tregs existieren keine Daten, ebenso wenig sind die molekularen Mechanismen der Liganden-induzierten Rezeptoraktivierung erforscht. Liganden der TNF Familie treten physiologischerweise in membranständiger und löslicher Form auf, welche sich in ihrem Potential den/die zugehörigen Rezeptoren zu aktivieren deutlich unterscheiden können. Für DR3 und seinen Liganden TL1A (*TNF-like protein 1A*) wurde dies noch nicht untersucht. Auch die nach Aktivierung des Rezeptors initiierten Signalwege sind bislang unvollständig verstanden. Bekannt ist vor allem eine pro-inflammatorische Wirkung durch die Aktivierung des NFκB und MAPK Signalwegs, unter bestimmten Voraussetzungen kann DR3 jedoch auch Apoptose induzieren. Weitere zytotoxische DR3-induzierte Signalwege sind bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die trimere Form des Liganden TL1A vollumfänglich in der Lage war, DR3 zu aktivieren. Die Verwendung von TL1A Konstrukten, welche den membranständigen Liganden mimikrierten, zeigte keine verbesserte Rezeptoraktivierung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass zur Aktivierung von DR3 lösliche TL1A Trimere ausreichend sind.

In dieser Arbeit wurde erstmals belegt, dass primäre humane Tregs DR3 exprimieren. Weiterhin konnte eine Funktionalität des Rezeptors auf dieser Zellpopulation anhand der Aktivierung von NFκB und der MAP Kinasen ERK und p38 demonstriert werden. TL1A-vermittelte DR3 Aktivierung führte zu einer gesteigerten Proliferation humaner Tregs *ex vivo*, wobei kein Verlust der suppressiven Wirkung dieser Zellpopulation registriert wurde.

Zudem erweiterten Signalweganalysen auch das Spektrum der DR3-assoziierten zytotoxischen Signalwege. Im letzten Jahrzehnt wurde Nekroptose, neben Apoptose, als zusätzliches geordnetes und reguliertes Zelltodprogramm entdeckt, charakterisiert und mit unterschiedlichsten Erkrankungen in Verbindung gebracht. Im Gegensatz zu apoptotischem Zelltod ist nekroptotischer Zelltod Caspase-unabhängig und hat im Organismus stark immunstimulierende Konsequenzen. Mit DR3 wurde in dieser Arbeit ein neuer Nekroptose-induzierender Rezeptor der TNF-Familie identifiziert. DR3-induzierte Nekroptose involvierte die Formation des sog. Nekrosoms, bestehend aus RIP1 (*Receptor-interacting protein 1*) und

RIP3, und die Aktivierung des Effektormoleküles MLKL (*Mixed lineage kinase domain-like protein*). Infolgedessen hatte die Inhibition dieser Moleküle über pharmakologisch-wirksame Substanzen oder RNA-Interferenz einen protektiven Effekt auf DR3-initiierte Nekroptose. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig die Expression und eine proliferationsfördernde Wirkung von DR3 auf humanen Tregs nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden die molekularen Mechanismen der Liganden-indizierten DR3 Aktivierung beschrieben und Nekroptose als ein neuer, DR3-assoziiierter zytotoxischer Signalweg charakterisiert.



## 1.2 Abstract

Death Receptor 3 (DR3) is a member of the Tumor-Necrosis-Factor (TNF) family. DR3 is involved in numerous biological processes like cell proliferation, inflammation, immune response and programmed cell death. DR3 was initially described as a T-cell co-stimulatory molecule. Since then, involvement of DR3 has been documented in many different (T-cell-mediated) inflammatory diseases.

Recently, DR3 gained attention due to its anti-inflammatory function. Activation of DR3 allows selective expansion of regulatory T-cells (Tregs) *in vivo*. This strategy was applied to curtail unwanted autoreactive immune responses in different mouse models. Hence, a truly promising therapeutic potential of this receptor was revealed during the last years, although there are only a few studies dealing with human DR3.

Until now, no data about expression and functionality of DR3 on human Tregs has been published and also molecular mechanisms of ligand-induced receptor activation have not been investigated yet. Ligands of the TNF family physiologically occur in a membrane-bound or soluble form, which can tremendously differ in their potential to activate the corresponding receptor. If potential differences exist for DR3 and its ligand TL1A (*TNF-like protein 1A*) has not been assessed so far. Besides, receptor-induced signaling pathways are only partially understood. A pro-inflammatory effect of DR3, due to activation of NF $\kappa$ B and MAP Kinase signaling pathways, is well-known. However, under certain conditions DR3 may also induce apoptosis. Additional DR3-induced cytotoxic pathways are not known.

This work showed that the trimeric form of the ligand TL1A was fully capable of activating DR3. TL1A constructs which mimicked the membrane-bound form of the ligand did not show enhanced receptor activation, indicating that soluble TL1A trimers are sufficient for DR3 activation.

In this study DR3 expression on primary human Tregs was proved for the first time. Signaling functionality of the receptor was demonstrated by activation of NF $\kappa$ B and MAP Kinases ERK and p38. TL1A-mediated DR3 activation resulted in increased proliferation of Tregs *ex vivo* without affecting the suppressive capacity of this cell population.

Furthermore, exploration of intracellular signaling revealed a novel DR3-induced cytotoxic pathway. In addition to apoptosis, necroptosis was described and characterized as an ordered and regulated cell death program in the last decade. Moreover, necroptotic cell death was linked to diverse diseases during the last years. In contrast to apoptotic cell death, necroptotic cell death is caspase-independent and is highly immunogenic. This work characterized DR3 as a novel necroptosis-inducing receptor within the TNF family. DR3-initiated necroptosis involved formation of the so-called necrosome complex, consisting of RIP1 (*Receptor-interacting protein 1*) and RIP3, and activation of the effector protein MLKL (*Mixed lineage kinase domain-like protein*). Consequently pharmacological inhibition of these molecules or knock-down via RNA interference had a protective effect against DR3-induced necroptosis.

In sum, this work demonstrated for the first time DR3 expression as well as a proliferation promoting effect of this receptor on human Tregs. Moreover, molecular mechanisms of ligand-induced DR3 activation were described and necroptosis as a novel, DR3 associated cytotoxic signaling pathway was characterized.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Superfamilie**

Moleküle der TNF Superfamilie sind hoch konserviert in fast allen Säugetieren zu finden. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Kommunikation von Zellen und Geweben im Organismus und sind dabei wichtige Regulatoren der Gewebshomöostase, bei Entwicklungsprozessen und Entzündungsvorgängen [1, 2].

Die Nekrose-induzierende Wirkung eines Serumfaktors wurde bereits in den 1960er Jahren beschrieben und der unbekannte Faktor als Tumor-Nekrose-Faktor bezeichnet. Identifiziert wurde TNF erstmals 1984 von Aggarwal *et al.*, der beinahe gleichzeitig zwei zytotoxische Faktoren isolierte und charakterisierte. Das eine, von Makrophagen stammende und 17 kDa große Protein wurde als TNF $\alpha$  bezeichnet [3]. Das zweite, von Lymphozyten stammende und 20 kDa schwere Protein wurde Lymphotoxin genannt [4]. Seitdem wurden insgesamt 19 Liganden und 29 Rezeptoren beschrieben, die der TNF Superfamilie zugeordnet werden.

#### **2.1.1 Liganden der TNF Familie**

Die 19 Liganden der TNF Familie werden fast alle (mit Ausnahme von Lymphotoxin- $\beta$ ) als Typ-II Transmembranproteine exprimiert. Die Transmembranproteine beinhalten eine carboxy-terminale (C-terminal) extrazelluläre Domäne, welche als „Tumor-Nekrose-Faktor Homologiedomäne“ (THD) bezeichnet wird. Die THDs der TNF-Liganden weisen eine charakteristische, konservierte Aminosäuresequenzen auf, welche zu 20 bis 30 Prozent identisch sind (Übersicht bei Bodmer *et al.* 2002 [1]). Die THD besteht aus zwei übereinander gelagerten  $\beta$ -Faltblättern und ist für die nicht-kovalente Zusammenlagerung von Liganden zu Homotrimeren und die Bindung an den zugehörigen Rezeptor essentiell. Des Weiteren besitzen TNF Liganden eine *singlepass* Transmembrandomäne und eine amino-terminale (N-terminale) intrazelluläre Domäne.

Die extrazelluläre Domäne eines membrangebundenen TNF Liganden kann durch proteolytische Enzyme (i.d.R. Metalloproteinasen) abgespalten und auf diese Weise eine lösliche, trimere Form des Liganden generiert werden. Außerdem können lösliche Liganden durch alternatives Spleißen gebildet werden. Physiologisch kommen deshalb sowohl lösliche als auch membrangebundene Liganden im Organismus vor. Die Fähigkeit den zugehörigen Rezeptor zu aktivieren, kann sich von löslichen zu membrangebundenen Liganden enorm unterscheiden, obwohl beide Formen als Trimere organisiert sind und die gleiche Bindungsaffinität zum Rezeptor aufweisen. Beispielsweise ist TNF sowohl als löslicher als auch membrangebundener Ligand in der Lage TNFR1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*) voll umfänglich zu aktivieren. Die Aktivierung von TNFR2 ist allerdings nur durch membranständiges TNF möglich [5, 6]. Andere TNF Liganden wie beispielsweise OX40L [7], CD27L, CD40L, 4-1BBL [8] und CD95L [9] weisen in ihrer löslichen Form, trotz Bindung an den Rezeptor, kaum Potenzial zur Rezeptoraktivierung auf. Interessanterweise können diese löslichen Liganden aber durch Immobilisierung an der Zelloberfläche oder

durch artifizielle, sekundäre Oligomerisierung stark rezeptoraktivierend wirken [7, 8]. Diese artifiziell oligomerisierten Agonisten, welche die membranständige Form des Liganden mimikrieren, können von therapeutischem Nutzen sein.

### 2.1.2 Rezeptoren der TNF Familie

Rezeptoren der TNF Familie (TNFRs) werden an der Zelloberfläche überwiegend als *singlepass* Typ-I Transmembranproteine exprimiert. Lediglich die Rezeptoren TACI (*Transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor*), BFFR (*BAFF receptor*), BCMA (*B-cell maturation antigen*) und XEDAR (*X-linked EDA receptor*) werden den Typ-III Transmembranproteinen zugeordnet. Charakteristisch für TNF Rezeptoren ist eine oder mehrere Cystein-reiche Domänen (CRDs) im N-terminalen, extrazellulären Teil des Rezeptors [1, 10]. Eine CRD beinhaltet 40 Aminosäuren mit sechs Cysteinresten, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken zur Stabilisierung des Rezeptors beitragen. CRDs sind sowohl für die Bindung des Liganden [11], als auch die Rezeptortrimerisierung in Abwesenheit von Liganden wichtig. Ein weiterer N-terminaler Bestandteil einiger TNF-Rezeptoren ist die *pre-ligand assembly domain* (PLAD). Diese hat zwar keinen Einfluss auf die Ligandenbindung, spielt aber möglicherweise bei der Trimerisierung von Rezeptoren in Abwesenheit des Liganden eine Rolle [12-14].

Die Mitglieder der TNFR Familie besitzen typischerweise eine relative hydrophobe Transmembrandomäne, welche aus 20 bis 30 Aminosäuren besteht und als Sekundärstruktur eine  $\alpha$ -Helix ausbildet [1]. Ausnahmen bilden die sezernierten Rezeptoren Decoy Rezeptor 3 (DcR3) und Osteoprotegerin sowie DcR1, welcher über ein kovalent gebundenes Glykolipid in der Zellmembran verankert ist [15, 16]. Auch von membranständigen Rezeptoren wie z.B. CD27, CD30, CD40, TNFR1 und TNFR2, kann durch Proteolyse im extrazellulären Bereich eine lösliche Rezeptorvariante generiert werden [16, 17]. Alternatives Spleißen kann bei CD95 und 4-1BB ebenfalls zur Sekretion von löslichen Rezeptoren führen [11]. Diese löslichen Varianten kompetieren mit membranständigen Rezeptoren um Liganden und neutralisieren somit deren Wirkungspotential. Außerdem wird durch die Abspaltung des Rezeptors von der Zelloberfläche die Rezeptorzahl auf der Zell vermindert, was die Sensitivität der Zellen zusätzlich vermindert [18].

Im intrazellulären Bereich der acht Rezeptoren TNFR1, TRAILR1 und 2 (*Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*), DR3 (*Death Receptor 3*), CD95 (Fas), EDAR (*Ectodysplasin A receptor*), DR6 und p75-NGFR (*Low-affinity nerve growth factor receptor*) befindet sich eine sogenannte Todesdomäne (*death domain*, DD). Dabei handelt es sich um eine C-terminal gelegene, 70-80 Aminosäuren lange Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Daher werden diese acht Rezeptoren als Todesrezeptoren bezeichnet [19]. Über die DD können bei Rezeptoraktivierung Adaptermoleküle und pro-apoptotische Proteasen an den Todesrezeptor rekrutiert und dadurch Zelltod initiiert werden. Im Gegensatz dazu, aktivieren Rezeptoren ohne DD über Bindung von Adaptermolekülen der TRAF (*TNFR-associated factor*) Familie vor allem pro-inflammatorische Signalkaskaden wie beispielsweise MAPK Kinasen (*Mitogen-activated protein kinase*) oder NF $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa B*) [16].

### 2.1.3 Signaltransduktion von Todesrezeptoren

Die Signaltransduktion von Todesrezeptoren kann metaphorisch als zweischneidiges Schwert bezeichnet werden. Durch die Stimulation von Todesrezeptoren kann entweder der Tod einer Zelle induziert werden oder aber ihr Überleben sowie Proliferation gefördert und ihre Funktionalität beeinflusst werden. Die Todesrezeptoren unterscheiden sich dabei in ihrer primären Signalantwort. Bei CD95 und TRAILR1/2 beispielsweise dominiert der Zelltod-Induktion als primäre Konsequenz der Ligandenbindung, da diese Rezeptoren über das Adapterprotein FADD (*Fas-associated protein with death domain*) direkt Caspasen rekrutieren können. Die Rezeptoren TNFR1 und DR3 hingegen aktivieren über einen rezeptorgebundenen Signalkomplex (Komplex I) meist in erster Linie verschiedene Signalkaskaden und induzieren Gentranskription [20]. Zelltod wird von diesen Rezeptoren nur initiiert, wenn die primäre Signalantwort zu schwach oder unterbrochen ist. Ausschlaggebend ist hierbei die Bildung eines sekundären, zyttoplasmatischen Komplexes (Komplex II, siehe Abbildung 2).

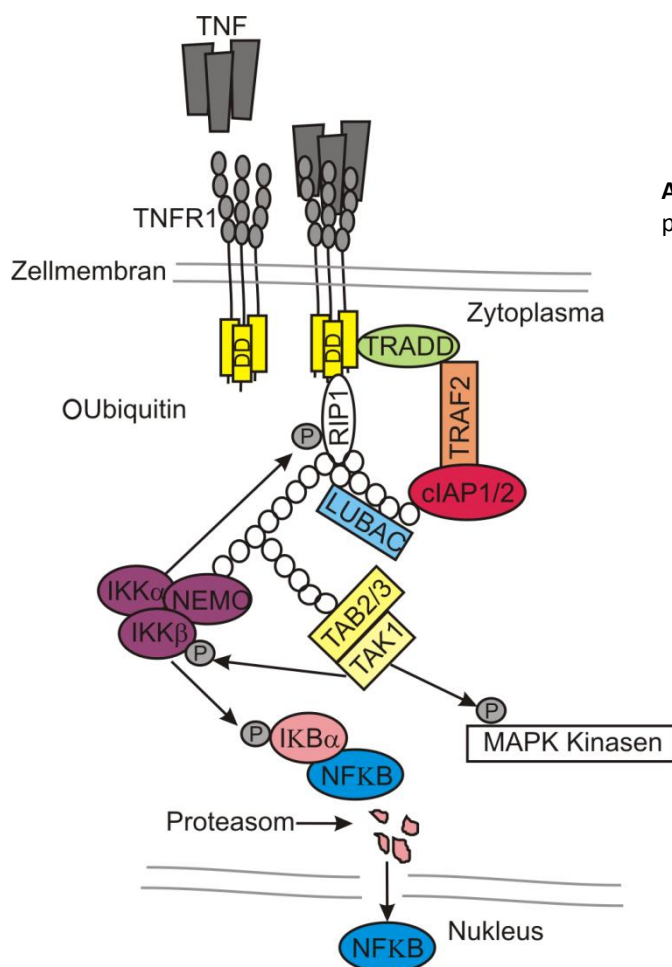
TNF und TNFR1 sind als Ligand-Rezeptor System nach jahrzehntelanger Forschung innerhalb der TNF Familie am besten untersucht. Der Todesrezeptor DR3, der im Fokus dieser Arbeit steht, weist die höchste Sequenzähnlichkeit zu TNFR1 innerhalb der TNF Familie auf (siehe 2.2). Daher wird im Folgenden die Signaltransduktion anhand des TNF/TNFR1 Systems beschrieben (siehe Abbildung 1).

Unter physiologischen Bedingungen hat die Bindung von TNF an TNFR1 zunächst eine pro-inflammatorische Wirkung. Die Bindung des trimeren Liganden führt zu einer Konformationsänderung im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, wodurch die Rekrutierung von TRADD (*TNF-receptor associated death domain*) über die Todesdomäne ermöglicht wird [21]. Anschließend wird innerhalb weniger Minuten durch Rekrutierung von RIP1 (*Receptor-interacting protein kinase 1*), TRAF2 und/oder TRAF5 sowie cIAP1/2 (*cellular Inhibitor of apoptosis proteins 1/2*) die Bildung von Komplex I vollzogen [22-24]. Die Anwesenheit von FADD im Komplex I wird kontrovers diskutiert [23, 25]. Gleichzeitig transloziert der Rezeptorkomplex innerhalb der Zellmembran zuerst in Lipid Rafts [26], bevor er innerhalb von wenigen Minuten über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert [25]. Während der Signalkomplexbildung versehen die E3-Ubiquitin Ligasen cIAP1/2 die Kinase RIP1 (und möglicherweise andere Komponenten) mit K63-, K11- und K48 verknüpften Polyubiquitin-Ketten [27-30]. Diese Polyubiquitylierung stellt ein Gerüst zur Rekrutierung weiterer Komponenten dar und ist essentiell für die Weiterleitung des Rezeptorsignals.

Als nächste Komponente bindet der sog. LUBAC (*Linear ubiquitin chain assembly complex*)-Komplex an den polyubiquitylierten Rezeptorsignalkomplex. Dieser, bestehend aus den Untereinheiten HOIP, HOIL-1 und Sharpin, versieht u.a. RIP1, TRADD und den TNFR1 mit linearen Ubiquitin-Ketten [28, 31-33], was die Komplexität des Ubiquitin-Netzwerks zusätzlich erhöht. Die Ubiquitylierung verschiedener Komplex I Komponenten dient als Plattform zur Rekrutierung von TAB2/3 (*TAK1 binding protein 2/3*) und dessen Interaktionspartner TAK1 (*Transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1*). Hierbei erfolgt die Bindung des TAB2/3 Komplex über dessen Ubiquitin-Bindedomäne, die spezifisch K63-verknüpftes Ubiquitin bindet [34]. Zusätzlich wird der NEMO-IKK $\alpha/\beta$  (*NF-kappa-B essential modulator-IkB kinase kinase*)-Komplex über lineare M1- und auch K63-verknüpfte Ubiquitin-Ketten mittels Ubiquitin-Bindedomäne von NEMO rekrutiert [35-37]. Nun kann

TAK1, vermutlich aufgrund räumlicher Nähe, IKK $\beta$  sowie MAP Kinasen und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) phosphorylieren und aktivieren [35, 38, 39]. IKK $\beta$  wiederum phosphoryliert daraufhin den NF $\kappa$ B Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  (*Inhibitor of NF $\kappa$ B  $\alpha$* ) und markiert diesen dadurch für Ubiquitinylierung und proteasomalen Abbau. Aufgrund ihrer Kernlokalisierungssequenz können schließlich NF $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren, die nach I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation freigesetzt wurden, in den Nukleus translozieren und Gentranskription initiieren (eine detaillierte Übersicht zu TNF vermittelter NF $\kappa$ B Induktion findet sich bei Hayden *et al.* [40]).

Um eine transiente und kontrollierte TNF Antwort sicherzustellen benötigt die NF $\kappa$ B Aktivierung zum einen aktive Repression. Wichtige Regulatoren sind hierbei die Deubiquitinasen Cylindromatosis (CYLD) und A20. Diese entfernen aktiv Ubiquitin von Komplex I Komponenten (u.a. RIP1, NEMO und TRAF2), wodurch die Plattform zur Rekrutierung von IKK $\alpha/\beta$  und TAK1 zerstört wird [32, 41, 42]. Zum anderen werden durch NF $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren auch inhibitorische Gene wie I $\kappa$ B $\alpha$  hochreguliert, die helfen das Signal wieder abzuschalten.



**Abbildung 1.** Schema zum Aufbau des primären TNFR1 Signalkomplex (Komplex I)

Zusätzlich zu dieser primär pro-inflammatorischen Signalantwort kann TNFR1 über seine Todesdomäne jedoch auch Zelltod auslösen. Die Induktion von pro-inflammatorischen Signalwegen wirkt der Zelltod-Induktion aber über zwei unterschiedliche Checkpoints entgegen. Man unterscheidet dabei zwischen einem späten und einem frühen Checkpoint [43].

Zur Zelltod-Induktion muss die Assemblierung des zytosolischen Komplexes II stattfinden. Dabei dissoziiert das Adaptermolekül TRADD vom Komplex I und interagiert mit FADD. FADD bildet eine Plattform für Caspase-8 Rekrutierung und Aktivierung [22]. Ein wichtiger Regulator ist dabei cFLIP<sub>L</sub> (*cellular FLICE-inhibitory protein, long form*), ein Caspase-8 Homolog ohne katalytische Domäne. Durch NFκB Aktivierung wird cFLIP<sub>L</sub> (und auch andere anti-apoptotische Proteine [44]) hochreguliert und kompetiert mit Caspase-8 um die Bindung an FADD. Sind die NFκB Aktivität und damit einhergehende cFLIP<sub>L</sub> Level allerdings niedrig, kommt es zur Aktivierung von Caspase-8 und apoptotischem Zelltod [22, 45, 46]. Der pro-apoptotische Komplex bestehend aus TRADD, FADD und Caspase-8 wird in diesem Fall auch als Komplex IIa bezeichnet (siehe Abbildung 2). Durch genetische Deletion des NFκB Transkriptionsfaktors p65, Expression einer degradations-resistenten IκBα Variante und pharmakologische Inhibition der Translation konnte Zelltod infolge von TNFR1 Stimulation demonstriert werden [22, 47-49]. Die Inhibition des NFκB Signalweges sensibilisiert somit gegenüber TNFR1-induziertem Zelltod.

Zelluläre cFLIP Level werden außerdem über die Stabilität des Proteins, welches *per se* eine geringe Halbwertszeit aufweist, reguliert. Die E3-Ubiquitin Ligase Itch beispielsweise kann, nach erfolgter Aktivierung durch JNK, cFLIP ubiquitinylieren und damit zum proteasomalen Abbau markieren [50].

Der TNF/TNFR1 Signalweg verhindert somit indirekt durch Genexpression die mögliche Apoptose-Induktion („später Checkpoint“).

Zusätzlich zu diesem „späten Checkpoint“ verhindert ein früher einsetzender Checkpoint ebenfalls TNF-induzierten Zelltod. Hierbei spielt die Serin/Threonin Kinase RIP1 und deren Ubiquitinylierungsstatus sowie Kinaseaktivität eine entscheidende Rolle. Wird in RIP1-defizienten Zellen wildtyp RIP1 oder mutiertes, nicht-ubiquitinylierbares RIP1 eingebracht, weisen die Zellen mit mutiertem RIP1 eine erhöhte Sensitivität gegenüber TNF auf [51]. Interessanterweise zeigt sich die gleiche erhöhte Sensitivität dieser Zellen auch unter NFκB Inhibition. Die Beobachtung deutet auf einen zweiten Mechanismus der Zelltodinhibition im TNFR1 Signalweg hin, der unabhängig von Transkription ist. Durch Depletion von cIAP1/2 oder LUBAC wird ebenfalls die RIP1 Ubiquitinylierung gestört, was dementsprechend wiederum zu erhöhter TNF Sensitivität von Zellen führt. Dies konnte durch eine Reihe von Studien *in vitro* und *in vivo* in den letzten Jahre bestätigt werden [49, 52-55]. In weiteren Arbeiten wurde zudem bewiesen, dass auch die Komponenten TAK1, NEMO und IKKα/β wichtige Regulatoren dieses frühen Checkpoints sind. Die Inhibition oder Deletion dieser Moleküle führt, ohne dabei den Ubiquitinylierungsstatus von RIP1 zu verändern, zu RIP1 Kinase-abhängiger Apoptose [47, 48, 56, 57]. Das gegenwärtige Modell besagt, dass die Rekrutierung all dieser Moleküle letztendlich zu Aktivierung von IKKα/β führt, woraufhin IKKα/β durch Phosphorylierung RIP1 inhibiert (siehe Abbildung 1) [47]. Ist dieser frühe Checkpoint gestört, sei es durch Abwesenheit von cIAP1/2, Sharpin, TAK1 oder NEMO, wird durch RIP1 die Bildung des zytosolischen Komplex IIb initiiert. Dieser besteht aus RIP1, FADD, cFLIP und Caspase-8, ist abhängig von der RIP1 Kinaseaktivität [49] und leitet letztendlich Caspase-abhängige Apoptose oder Caspase-unabhängige Nekroptose ein.

### 2.1.4 Todesrezeptor-induzierte Apoptose

Apoptose bezeichnet das programmierte bzw. kontrollierte, Caspase-abhängige Absterben einer Zelle. Morphologische Kennzeichen von Apoptose sind Membran „*budding*“ oder „*blebbing*“, Volumenkontraktion der Zelle und Zellkernfragmentierung [58]. Die beim *budding* entstehenden apoptotischen Vesikel, welche sich unter Aufrechterhaltung der Membranintegrität von der sterbenden Zelle abschnüren, werden im Organismus letztendlich (fast) ohne Entzündungsreaktion von Phagozyten aufgenommen und verdaut [59].

Die Todesrezeptoren der TNF Familie können als Auslöser für Apoptose fungieren und damit unterschiedlichste Prozesse und Funktionen im Organismus regulieren.

Während FADD-rekrutierende Todesrezeptoren wie TRAILR1/2 und CD95 nach Ligandenbindung direkt Initiatorcaspasen aktivieren, muss im Fall von TNFR1 und DR3 zur Aktivierung von Caspasen einer der beiden Checkpoints abgeschaltet sein und die Formation von Komplex IIa oder IIb zustande kommen (siehe 2.1.3). CD95 und TRAILR1/2 binden über die DD das Adapterprotein FADD. FADD wiederum kann über eine *death effector domain* (DED) direkt mit den Initiatorcaspasen 8 und 10 interagieren [60, 61]. Die Initiatorcaspasen, welche im Zytosol als Monomere vorliegen, bilden aufgrund räumlicher Nähe Homodimere [62]. Dieser Vorgang startet einen proteolytischen Aktivierungsprozess, bei dem schließlich aktive, heterotetramere Caspase-8 oder Caspase-10 generiert wird [63]. Ab diesem Punkt laufen die apoptotischen Signalwege von TRADD- und FADD-bindenden Todesrezeptoren wieder vergleichbar ab. Es gibt allerdings auch regulatorisch wirkende Proteine, welche die Einleitung der Apoptose an diesem Punkt verhindern können. Beispielsweise inhibieren die Spleißvarianten von cFLIP, cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>S</sub>, die Caspase-8 Aktivierung [64] und steuern darüber hinaus, ob nekroptotischer Zelltod eingeleitet wird.

Anschließend werden durch Caspase-8 und Caspase-10 die Effektorcaspasen aktiviert. Allerdings ist Effizienz deren Aktivierung vom Zelltyp abhängig. Ist die Aktivierung der Initiatorcaspasen stark genug um eine robuste Aktivierung von Effektorcaspasen und damit Apoptose einzuleiten, spricht man von Typ-I Zellen. In Typ-II Zellen hingegen, muss eine Amplifikation des pro-apoptotischen Signals über das Mitochondrium erfolgen [60]. Die Gründe für die Notwendigkeit der Amplifikation können z.B. niedrige Rezeptorexpression [65], verminderte Expression von Caspasen oder auch erhöhte Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie XIAP sein [66, 67]. Die Caspase-8 vermittelte Spaltung des BH3-only Proteins Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) generiert tBid (*truncated Bid*). tBid lokalisiert dann an der äußeren mitochondrialen Membran und aktiviert Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*), wodurch es zur Oligomerisierung von Bak und Bax kommt (*Bcl-2 associated X-protein*). Durch diese Oligomerisierung kommt es zur Porenbildung innerhalb der äußeren mitochondrialen Membran und zur Freisetzung pro-apoptotischer Moleküle wie beispielsweise Cytochrom c, SMAC/DIABOLO (*Second mitochondria-derived activator of apoptosis/ Direct IAP binding protein with low pI*) und HtrA2/Omi ins Zytoplasma [61, 68-70]. Im Zytoplasma bildet Cytochrom c zusammen mit Apaf-1 (*Apoptosis inducing factor-1*), und Procaspase-9 ATP-abhängig das sog. Apoptosom. Dabei selbst aktiviert, kann Caspase-9 als Initiatorcaspase die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 spalten bzw. aktivieren [71]. Die freigesetzten Moleküle SMAC/DIABOLO und HtrA2/Omi verstärken diesen Effekt, da sie Caspase-inhibierende IAPs neutralisieren und somit eine effizientere Apoptose-Induktion erlauben. Die Effektorcaspasen können schließlich ihre zellulären

Substrate wie z.B. Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, Lamine, Aktine und Cytokeratine spalten und damit das Absterben der Zelle vollziehen (Übersicht bei Parrish *et al.* 2013, [72]).

### 2.1.5 Das nekroptotische Zelltodprogramm

Obwohl die ersten morphologischen Beobachtungen zum Absterben von Zellen bereits Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben wurden, wurde der Begriff „programmierter Zelltod“ erst 1964 von Lockshin verwendet. 1972 benutzte Kerr erstmals den Begriff Apoptose für eine bestimmte morphologische Form des Zelltodes bei Säugerzellen ein [73]. Danach wurde über Jahrzehnte Apoptose mit „programmiertem Zelltod“ und Nekrose mit „zufälligem/unfallartigem Zelltod“ gleichgesetzt. Allerdings wurde über die Jahre immer mehr deutlich, dass auch Nekrose nicht zwangsläufig unkontrolliert und ungeordnet abläuft. Letztendlich führten Chan *et al.* 2003 den Begriff Nekroptose ein, um kontrollierte Nekrose als neues Zelltodprogramm zu beschreiben [74].

Bei ablaufender Nekroptose schwillt die Zelle zuerst an, platzt dann regelrecht auf und setzt intrazellulären Inhalt in seine Umgebung frei. Freigesetzte Moleküle wie beispielsweise HGMB1 (*High mobility group box 1 protein*), mitochondriale DNA oder Hitzeschockproteine können als DAMPs (*Damage-associated molecular pattern*) fungieren und Immunzellen aktivieren. Nekroptotischer Zelltod hat daher, im Gegensatz zu apoptotischem Zelltod, eine starke inflammatorische Wirkung im Organismus.

Nekroptose wird durch Todesrezeptoren der TNF Familie wie beispielsweise TNFR1, TRAIL1/2 und CD95 ausgelöst [75, 76]. In neuen Arbeiten wurden zudem die Toll-like Rezeptoren 3 und 4 (TLR3/4) [77, 78] sowie Interferon Rezeptoren [79] als Nekroptose induzierend beschrieben. Des Weiteren kann auch das intrazelluläre Protein DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*), welches zytoplasmatische Doppelstrang DNA sowie virale RNA erkennt und damit als viraler Sensor agiert, Nekroptose auslösen [80-82].

TNFR1-induzierte Nekroptose ist wohl auf molekularer Ebene am besten charakterisiert und soll im Folgenden als Beispiel dienen (siehe Abbildung 2). Bei intaktem TNFR1 Signal wird, wie unter 2.1.3 beschrieben, vor allem eine pro-inflammatorische zelluläre Antwort induziert und Zelltod-Induktion blockiert. Daher tritt auch nekroptotischer Zelltod im Falle von TNF und TNFR1 in den meisten Zelltypen nur unter Blockade von Transkription/Translation oder bei unvollständiger Komplex I Formation, beispielsweise nach cIAP Depletion, auf.

In diesem Fall dissoziiert RIP1 nach TNFR1 Aktivierung von der Membran und bildet zusammen mit FADD, Procaspase-8, RIP3 und cFLIP einen zytoplasmatischen Komplex II [22, 48, 49, 51, 52]. Dies ist allerdings nur möglich, wenn Ubiquitynylierung und nachfolgende IKK $\beta$ -vermittelte (inhibierende) Phosphorylierung von RIP1 ausbleibt (siehe 2.1.3).

In diesem Komplex II entscheidet die Aktivität von Caspase-8 über das Schicksal der Zelle. Bilden sich Procaspase-8 Homodimere, so können diese sich über Auto-Proteolyse aktivieren und Apoptose induzieren (siehe 2.1.4). Außerdem können sich in Anwesenheit des Caspase-8-homologen Proteins cFLIP<sub>L</sub> auch Procaspase-8-cFLIP<sub>L</sub> Heterodimere zusammenfinden. Diese weisen eine katalytische Restaktivität auf und inhibieren aktiv Nekroptose indem sie





### 2.1.6 Die (patho-) physiologische Relevanz von Nekroptose

Die genetische Deletion von RIP3 oder MLKL bei Mäusen hat keinen Defekt in deren Entwicklung, Fertilität oder Homöostase zur Folge. Dies weist darauf hin, dass Nekroptose keine Bedeutung für diese Prozesse hat [102, 103]. Man geht davon aus, dass sich Nekroptose im Laufe der Evolution als eine Art Backup-Mechanismus zur Eliminierung von intrazellulären Pathogenen entwickelt hat. Durch Apoptose von infizierten Zellen und anschließender Phagozytose der sterbenden Zellen samt Inhalt können Erreger im Organismus beseitigt werden. Allerdings haben Pathogene unterschiedlichste Mechanismen entwickelt, um der immunologischen Beseitigung zu entgehen indem sie die Apoptose Maschinerie des Wirtes inhibieren [104]. In diesem Szenario führt die Aktivierung des nekroptotischen Zelltodprogramms zur Freisetzung von DAMPs, der Rekrutierung von Immunzellen und der Beseitigung des Erregers. Die Notwendigkeit von Nekroptose als Backup Mechanismus konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in zahlreichen Studien bewiesen werden (Übersicht bei Vanden Berghe *et al.* [105]). Beispielsweise ist für RIP3-defiziente Mäuse, im Gegensatz zu Kontrollmäusen, eine Infektion mit Vaccinia-Virus, welcher einen viralen Caspase-Inhibitor exprimiert, letal [87]. Ebenso zeigen RIP3-defiziente Mäuse gegenüber Influenza A Virus eine erhöhte Sensibilität [106]. Ausschlaggebend hierfür ist die verminderte Beseitigung des Virus durch das Immunsystem, da kein nekroptotischer Zelltod infizierter Zellen auftritt.

Interessanterweise haben beispielsweise Herpesviren ihrerseits wiederum Mechanismen entwickelt um neben Apoptose auch Nekroptose zu inhibieren [107]. Und auch enteropathogene und enterohämorrhagische *Escherichia coli* interferieren mit apoptotischen und nekroptotischen Signalwegen [108, 109].

Darüber hinaus konnten zahlreiche aktuelle Arbeiten programmierte Nekrose als zentrales pathophysiologische Ereignis bei unterschiedlichsten Krankheiten determinieren. So ist Nekroptose assoziiert mit Schlaganfall und Herzinfarkt [110], Arteriosklerose [111], Pankreatitis [86, 102], Ischämie-Reperfusionsschaden [112, 113], und entzündlichen Darmerkrankungen [114, 115]. Die Beteiligung von nekroptotischem Zelltod ist für diese Erkrankungen nachgewiesen, allerdings ist häufig der molekulare Auslöser des zellulären Selbstmordprogramms unbekannt.

Da Nekrose nach einem geordneten Programm ablaufen kann, ist eine Intervention mittels pharmakologischen Inhibitoren möglich (siehe Abbildung 2). Daher wurden in der Vergangenheit und werden aktuelle verschiedene Nekroptose-Inhibitoren entwickelt und auf therapeutische Anwendbarkeit getestet. Es besteht die Möglichkeit die RIP1 Kinaseaktivität spezifisch über Necrostatine zu blockieren und damit die Bildung des Nekrosoms zu verhindern [91]. Allerdings spielt RIP1 auch bei der Sekretion inflammatorischer Zytokine und Apoptose eine entscheidende Rolle, weshalb RIP3 und MLKL Inhibitoren aktuell im Fokus der Forschung stehen. RIP3 Inhibitoren wie GSK‘840, GSK‘843 und GSK‘872 blockieren zwar effektiv Nekroptose, sind aber aufgrund ihrer hohen Toxizität noch nicht therapeutisch nutzbar [116]. Größtes Potential hat der MLKL Inhibitor Necrosulfonamid (NSA), welcher humanes MLKL an Cys86 kovalent modifiziert, damit die Membranlokalisation verhindert und zusätzlich nur geringe Toxizität aufweist [94]. NSA interagiert allerdings nur mit humanem MLKL, was die Verwendung in präklinischen Mausmodellen ausschließt.

## 2.2 Death Receptor 3 und sein Ligand TL1A

DR3 wurde Ende der 1990er Jahre von mehreren Arbeitsgruppen mehr oder weniger gleichzeitig beschrieben. In der Literatur wird DR3 daher irrtümlicherweise auch als TNFRSF25, Apo-3, WSL-1, LARD (*Lymphocyte-associated receptor of death*) oder TRAMP (*TNF receptor-related apoptosis-mediated protein*) bezeichnet. Der Rezeptor besteht aus 417 Aminosäuren, hat ein daraus berechnetes Molekulargewicht von 45 kDa und wird als Typ-I Transmembranprotein exprimiert. Innerhalb der TNF Rezeptorfamilie weist DR3 auf Proteinebene mit ca. 63 Prozent Homologie die größte Ähnlichkeit zu TNFR1 auf. Die N-terminale Signalsequenz (aa 1-24) und die extrazelluläre Domäne mit vier Cystein-reichen Domänen (aa 25-198) werden gefolgt von einer Transmembrandomäne (aa 199-224) und einer intrazellulären Domäne (aa 225-417). Die intrazelluläre Domäne enthält eine DD, welche auf Sequenzebene zu 48 Prozent mit der DD von TNFR1 übereinstimmt [117]. Es wurden insgesamt 13 Spleißvarianten bei humanem und 10 Spleißvarianten bei murinem DR3 beschrieben [118-120].

Ursprünglich wurde DR3 als co-stimulatorisches Molekül auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben [119, 121]. Die DR3 Oberflächenexpression auf T-Zellen wird nach T-Zellrezeptor (TCR) Stimulation hochreguliert [122]. Innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen unterscheidet sich die DR3 Expression. Th9, Th17 und Treg Subpopulationen exprimieren im murinen System mehr DR3 als Th1 und Th2 Zellen [123, 124]. Mittlerweile wurde die Expression auch auf ILCs (*Innate lymphoid cells*), B-Zellen, Tubuluszellen der Niere und einigen weiteren Zelltypen nachgewiesen, wobei sich die Funktionalität von DR3 je nach Zelltyp unterscheidet (Übersicht bei Richard *et al.* [125]). Interessanterweise wurde auch endogene DR3 Expression auf Leukämie-Zelllinien [126, 127] und auf frisch isolierten CLL (chronisch lymphatische Leukämie) B-Zellen beschrieben [128].

*TNF-like protein 1A* (TL1A) ist der Ligand für DR3 und wird als Typ-II Transmembranprotein exprimiert. Durch Proteolyse kann außerdem die extrazelluläre Domäne inklusive THD abgespalten und sezerniert werden. TL1A wird konstitutiv oder als Antwort auf IL-1 $\beta$  oder TNF Stimulation von vaskulären Endothelzellen der Niere und Prostata exprimiert [121, 129]. Im Kontext der T-Zell Biologie sind Makrophagen und Dendritische Zellen, welche beispielsweise nach TLR4, TLR11 oder Fc-Rezeptor Stimulation TL1A sezernieren, die wichtigsten Produzenten des Liganden [130, 131]. Ob sich, wie in anderen Ligand-Rezeptor-Systemen der TNF Familie, die Effizienz der DR3 Aktivierung durch die lösliche oder membrangebundene Form des Liganden unterscheidet, wurde bislang nicht untersucht.

TL1A-DR3 Interaktion verstärkt T-Zell Proliferation sowie Zytokinproduktion und moduliert T-Zell Homöostase und Polarisation [125]. Das TL1A-DR3 System ist hauptsächlich durch Steigerung der T-Zellproliferation am Entzündungsort an der Pathologie unterschiedlicher entzündlicher Autoimmunkrankheiten beteiligt. TL1A- oder DR3-defiziente Mäuse weisen daher in Modellen experimenteller Autoimmunenzephalitis (EAE) [132] sowie Kollagen- und Antigen-induzierter Arthritis [133-135] stets ein milderer Krankheitsbild auf. Auch eine Beteiligung von TL1A und DR3 an (chronisch) entzündlichen Darmerkrankungen wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen [136-138]. Bei Infektionsmodellen mit Salmonella und Helminthen zeigten DR3<sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte Eradikation des Erregers [139, 140], bei

Infektion mit Murinem Zytomegalie-Virus und Vaccinia-Virus erhöhte Virustiter sowie gesteigerte Morbidität und Mortalität [122].

Passend zu den verschiedenen Mausmodellen, ist erhöhte TL1A Expression mit unterschiedlichen autoreaktiven Erkrankungen beim Menschen assoziiert. So wurden erhöhte TL1A Protein oder mRNA Level bei Patienten mit Morbus Chron, Colitis ulcerosa, rheumatoider Arthritis, Psoriasis und primärer biliärer Cholangitis gemessen [125].

Bislang haben sich nur wenige Studien mit den intrazellulären Signalkaskaden nach DR3 Aktivierung beschäftigt. Auf molekularer Ebene führt die Bindung von TL1A an DR3 zur Rekrutierung von TRADD, TRAF2, RIP1, cIAP1/2, HOIP, NEMO, TAK1 und IKKs [126, 127, 141]. Die Rekrutierung der Komponenten NEMO, TAK1, HOIP sowie IKK und die nachfolgende NFκB Aktivierung ist von den E3-Ubiquitin Ligasen cIAP1/2 abhängig [127]. In einem Überexpressionsystem wurde zudem eine Assoziation des Rezeptors mit FADD und Caspase-8 gefunden [130]. Man geht aufgrund der bisherigen experimentellen Daten und der strukturellen Ähnlichkeit des Rezeptors zu TNFR1 davon aus, dass DR3 und TNFR1 einen sehr ähnlichen primären Signalkomplex rekrutieren (siehe 2.1.3 und 2.1.4). Dementsprechend aktiviert DR3 in erster Regel MAPK Kinasen sowie den pro-inflammatorischen NFκB Signalweg, was zur Hochregulation anti-apoptotischer Proteine wie cIAP2 führt [121, 126, 130]. Erst nach (pharmakologischer) Inhibition des NFκB Signalweges kommt es zur Induktion Caspase-abhängiger Apoptose [121, 126]. Weitere DR3-induzierte zytotoxische Signalwege sind bislang nicht bekannt.

## 2.3 Regulatorische T-Zellen: eine exklusive Zellpopulation mit therapeutischem Potenzial

Regulatorische T-Zellen (Tregs) spielen eine fundamentale Rolle in Entwicklung und Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz. Die Treg-vermittelte Inhibition von Effektor T-Zellen (Teffs) und Antigen-präsentierenden Zellen ist essentieller Bestandteil der negativen Regulation immunologischer Entzündungsprozesse. Bei Tregs handelt es sich im Allgemeinen um CD4 und CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors) positive T-Zellen, welche suppressiv auf Teffs wirken [142]. Im peripheren Blut von Mäusen sind ca. 8-10 Prozent der Lymphozyten CD4 und CD25 positiv. Allerdings beinhaltet diese Population neben Tregs vor allem auch aktivierte T-Zellen. Der eigentliche Anteil an Tregs bei ca. 1 % liegt der Lymphozyten [143]. Als wichtigster Regulator von Tregs (und deshalb charakteristischer Marker für selbige) wurde der Transkriptionsfaktor FoxP3 (*Forkhead box protein 3*) identifiziert [144, 145]. FoxP3 fördert die Transkription typischer Treg Marker wie beispielsweise CD25 und CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), und reprimiert die Transkription von typischen Th1 und Th2 Zytokinen [146]. Eine Mutation im FoxP3 Gen von sog. *scurfy* Mäusen, welche den Funktionsverlust des Proteins zur Folge hat, illustriert die Bedeutung von FoxP3 für die Entwicklung von Tregs. Diese *scurfy* Mäuse besitzen keine Tregs, entwickeln eine lymphoproliferative Erkrankung und sterben bereits im Alter von 5-6 Wochen.

CD127 hingegen wird von aktivierten konventionellen T-Zellen, nicht aber von Tregs exprimiert. Die CD127-Expression korreliert daher invers mit der Suppressivität von T-Zellen und dient somit als eine Art Negativmarker für Tregs [147]. Eine Reihe von weiteren mehr oder weniger charakteristischen Treg-Markern wurde in den letzten Jahren beschrieben, wodurch Tregs wiederum in eine ganze Reihe von Treg-Subpopulationen unterteilt werden können. Dazu gehören z.B. die TNF Familienmitglieder TNFR2 und GITR, sowie der Transkriptionsfaktor Helios. Eine detaillierte Übersicht zu Treg-Markern und deren Funktionalität findet sich bei Chen und Oppenheim [148] sowie Schmetterer *et al.* [149].

Die Aktivität von Tregs ist, wie bei anderen T-Zellsubpopulationen, von TCR Aktivierung abhängig. Nach Aktivierung können Tregs allerdings andere Immunzellen Antigen-unabhängig inhibieren [142, 150]. Tregs proliferieren nach alleiniger TCR Stimulation nicht, sondern sie benötigen ein zweites co-stimulatorisches Signal durch IL-2 [151]. Im Gegensatz zu Teffs können Tregs geringe Mengen IL-2, aber auch IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 und weitere Zytokine sezernieren. In Co-Kulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass Tregs in der Lage sind effektiv die Proliferation und Zytokinproduktion von Teffs zu hemmen [143, 152, 153]. Wichtige funktionelle Wirkmechanismen von Tregs sind u.a. die Ausschüttung von suppressiv wirkenden Zytokinen wie IL-10, TGF- $\beta$  und IL-35 sowie die direkte Interaktion mit Teffs über Galektin-1, die zum Zellzyklusarrest der Teffs führt. Des Weiteren können Tregs über die Granzyme direkt Zelltod induzieren. Durch Abfangen von IL-2 mittels hoher CD25 Oberflächenexpression können Tregs Teffs auch indirekt in Apoptose treiben, da diesen dadurch kein lebensnotwendiges IL-2 mehr zur Verfügung steht. Die inhibierende Interaktion mit Dendritischen Zellen über CTLA-4, CD39 oder LAG3 führt indirekt letztendlich ebenfalls zu verminderter T-Zellaktivierung. Für eine detailliert

Zusammenstellung dieser Mechanismen wird auf einen Übersichtsartikel von E. A. Shevach verwiesen [154].

Regulatorischen T-Zellen wird aufgrund ihrer Eigenschaften großes therapeutisches Potential bei Autoimmunerkrankungen und ungewollten Immunantworten wie Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) oder Transplantatabstoßung. Nach zahlreichen vielversprechenden Mausmodellen zu GvHD, Transplantatabstoßung, entzündlichen Darmerkrankungen, Diabetes mellitus Typ 1 und rheumatoider Arthritis wurden in den letzten Jahren bereits einige Studien am Menschen durchgeführt [155]. Grundsätzlich werden dabei Tregs der Probanden aus peripherem Blut angereichert, *ex vivo* über TCR Stimulation und IL-2 expandiert und nach ca. zwei Wochen dem Probanden in großer Anzahl wieder zurückgegeben. Die größten Probleme dieser Strategie sind Reinheit und Auswahl der aufgereinigten Treg-Subpopulation sowie die Aufrechterhaltung der Funktionalität. Epigenetische Modifikationen, die während einer Expansion in wichtigen Genloci wie FoxP3 auftreten können, führen beispielsweise zum Verlust des suppressiven Phänotyps der Tregs [156]. Eine weitere interessante therapeutische Strategie ist die Expansion von Tregs *in vivo*. Notwendigerweise muss bei dieser Vorgehensweise ausschließlich die Treg-Zellpopulation spezifisch zur Proliferation gebracht werden. Vielversprechend ist beispielsweise die Treg-Expansion über TNFR2 Stimulation, die im Mausmodell eine Linderung von GvHD bewirkt [157] und auch im humanen System *in vitro* eine homogen-suppressive Treg-Population expandiert [158].

DR3 ist ebenfalls auf murinen Tregs exprimiert und vermag diese *in vivo* zur Proliferation zu anzuregen. Durch die Gabe eines DR3-spezifischen agonistischen Antikörpers oder eines agonistischen TL1A-Ig Fusionskonstrukts konnten FoxP3-positive Tregs *in vivo* expandiert werden und Mäuse im Modell der allergisch bedingten Lungeninfektion, einem Mausmodell für Asthma, protektiert werden [159, 160]. Die Treg-Proliferation scheint dabei von TCR Stimulation durch Autoantigene und endogener IL-2 Sekretion abhängig. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte in einem murinen, allogenen Herztransplantationsmodell nachweisen, dass DR3-vermittelte Treg-Expansion in Empfängerermäusen die Transplantatabstoßung vermindert und somit das Überleben der behandelten Tiere verlängert [161]. Im GvHD Mausmodell führte die Behandlung der Spendertiere mit dem agonistischen  $\alpha$ -DR3 Antikörper ebenfalls zum Anstieg der Treg-Frequenz innerhalb der T-Zellpopulation. Dies hatte zur Folge, dass nach Stammzell- und T-Zell-Transplantation bei den Empfängertieren verminderte GvHD Symptome auftraten und die Mäuse verbessertes Überleben zeigten [162]. Der erwünschte tumorizide Effekt der transplantierten T-Zellen blieb jedoch erhalten, was für eine mögliche therapeutische Anwendung essentiell ist. Über anti-DR3 Antikörper expandierte murine Tregs weisen einen aktivierten und gereiften Phänotyp und erhöhte suppressive Funktionalität *in vivo* auf [163].

Trotz dieser verheißungsvollen Ergebnisse wurde bisher weder die DR3-Expression auf, noch TL1A/DR3-initiierte Signalwege in humanen Tregs untersucht.

## 2.4 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollten grundlegende TL1A/DR3-vermittelte Signalwege auf Tumorzelllinien und primären Zellen untersucht werden. Da bislang unklar war, ob die membranständige und lösliche Form des Liganden TL1A unterschiedliches Potential zur Rezeptoraktivierung aufweisen, sollte dies notwendigerweise zuerst analysiert werden.

Neben der Aktivierung des Rezeptors, sind auch die initiierten Signalwege bislang unvollständig verstanden. Die DR3-vermittelte Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege wie NF $\kappa$ B und MAPK wurde beschrieben, unter bestimmten Voraussetzungen kann DR3 jedoch auch Apoptose induzieren. Weitere zytotoxische DR3-induzierte Signalwege sind bisher nicht bekannt. Die Entdeckung und Erforschung von Nekroptose als regulierte Form des Zellsterbens lieferte in den letzten Jahren eine wahre Datenflut zu molekularen Mechanismen und Auslösern dieses Zelltodprogramms. Daher stellte sich die Frage ob DR3 als Todesrezeptor in der Lage ist neben Apoptose auch Caspase-unabhängige Nekroptose zu initiieren und damit als Auslöser des Zelltodprogramms agieren kann.

DR3 hat neben seiner pro-inflammatorischen auch eine anti-inflammatorische Wirkung. Die Studien zu DR3-vermittelter Treg-Expansion in verschiedenen Mausmodellen deuten ein vielversprechendes therapeutisches Potenzial dieses Ligand-Rezeptorsystems an (siehe 2.4). Allerdings finden sich bisher in der Literatur keine Daten zu DR3-induzierten Signalwegen in, oder zu DR3-Rezeptorexpression auf humanen Tregs. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob humane Tregs den funktionellen Rezeptor exprimieren und ob dieser intrazelluläre Signalwege aktiviert.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Geräte**

Attune NxT Durchflusszytometer	ThermoFisher Scientific Inc, Waltham (USA)
Blaubrand® Zählkammer	Brand GmbH und Co KG Wertheim (Deutschland)
Branson Sonifier 450	Branson (Deutschland)
Blocktheromstat BT 100	Kleinfeld Labortechnik (Deutschland)
BZ-9000 Fluoreszenz Mikroskop	Keyence GmbH, Frankfurt (Deutschland)
Duomax 2030 Schüttelgerät	Heidolph, Schwabach (Deutschland)
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Eppendorf Centrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
FACS CANTO II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland)
Hera 240 Heraeus cell incubator	Heraeus instruments GmbH, Osterode (Deutschland)
INTAS Chemilux Pro	INTAS Science imaging instruments GmbH
Laminar-Flow Werkbank UVF	BDK Luft-und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen (Deutschland)
Leica DMIL Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (Deutschland)
MACSiMAG Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Microplate Reader Model 680	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Mini PROTEAN Electrophoresis System	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Reax 2 Schüttelgerät	Heidolph, Schwabach (Deutschland)



Victor3 Multilabel Reader	Perkin Elmer, Waltham ( USA)
Western Blot Tankblotter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland)

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

Biozym Filter Tips (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1ml)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf (Deutschland)
Biosphere Filter Tips (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1ml)	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht (Deutschland),
Eppendorf Cup (1.5 ml , 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Falcon tubes (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Jumbosep Inserts	Pall Corporation, Port Washington (USA) #4501677533
MACS Cell Separation Columns (LD, LS, MS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland) #130-042-901, #130-042-401, #130-042-201
Petrischale (15 cm) Tissue Culture	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht (Deutschland), REF 83.3903
PVDF Western Blotting Membran	VWR International GmbH, Darmstadt (Deutschland) PEQL39-4010
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht (Deutschland)
Spritze (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht (Deutschland)
Whatman Paper	Millipore GmbH, Schwalbach (Deutschland)
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht (Deutschland) REF 83.3911.002 / 83.3912.002
Zellkulturflaschen (unbehandelt)	Nagle Nunc GmbH, Langenselbold (Deutschland), 159926
Zellsieb (30 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland) Mat.No. 120-002-220
96-Well-Immuno-MaxiSorp-Platte	ThermoFisher Scientific Inc, Waltham (USA), #442404
6-Well Zellkulturplatte	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht (Deutschland), REF 83.3920
96-Well Zellkulturplatte (Falchboden)	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht (Deutschland), REF 83.3924
96-Well Zellkulturplatte (Rundboden)	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht (Deutschland), REF 83.3925

### 3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien

Acrylamid-Solution 4K (30% Mix 37.5:1)	Applichem, Darmstadt (Deutschland), Cat #A 1672.1000
Avidin-Fluorescein	R&D Systems®, Minneapolis (USA)
Birinapant	MedchemExpress Europe, Stockholm (Schweden)
B-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland), REF 31350-010
BSA	AppliChem, Darmstadt (Deutschland), Cat #A1391.0100
Butylhydroxyanisol (BHA)	Sigma Aldrich® GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
CM-H2DCFDA	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Cycloheximid	Biomol, Hamburg (Deutschland)
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	GIBCO /Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Deutschland) , Cat #41966
Etanercept	Pfizer, Berlin (Deutschland)
Flag® Peptide	Sigma-Aldrich® GmbH, Taufkirchen (Deutschland) #F3290
Fötale Kälber Serum (FKS)	Gipco, Inoza, PAN Biotech, Aidenbach (Deutschland)
GM-CSF	Immunotools, Friesoythe (Deutschland)
GSK‘872	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyl tetrazolium bromide)	Biomol, Hamburg (Deutschland)
Necrostatin-1	Stress-Marq, Victoria (Kanada)
Necrostatin-1s (7-Cl-O-Nec1)	Tebu-bio GmbH, Offenbach (Deutschland)
Necrosulfonamide	Tocris Bioscience, Bristol (UK)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	ThermoFisher Scientific Inc, Waltham (USA) Cat #26616
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	ThermoFisher Scientific Inc, Waltham (USA) Cat #26619
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich® GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Penicilin/ Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach (Deutschland) P10-023500
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich® GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Proleukin S (Interleukin-2)	Novartis, Basel (Schweiz)
Propanol	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Protease Inhibitoren (Complete EDTA-free)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland), Cat #04693132001
Protein G-Agarose	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland) REF 11719416001
Rapamycin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
humanes TNFα	D. Männel, Universität Regensburg (Deutschland)
RPMI 1640	PAN Biotech GmbH, Aidenbach (Deutschland)
Roti®-block Konzentrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland), #A151.2
SMAC mimetics BV6, LCL161	Selleck Chemicals, Houston (USA)
TexMACS Medium	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland) #130-097-196
Triton X-100	Sigma Aldrich® GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Trypanblau 0,5% (w/v)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Tween 20®	Sigma Aldrich® GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
zVAD-fmk (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone)	Bachem, Bubendorf (Schweiz)
7-AAD	R&D Systems®, Minneapolis (USA)

17-AAG	Selleck Chemicals, Houston (USA)
(5Z)-7-oxozeaenol	Biomol, Hamburg (Deutschland)

### 3.1.4 Kits

BCA Protein Assay Kit Pierce™	ThermoFisher Scientific Inc, Waltham (USA)
Cell Meter™ Caspase 3/7 Activity Apoptosis Assay Kit	AAT Bioquest, Sunnyvale (USA), # 22796
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>dim/-</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland) # 130-094-775
CFDA SE Cell Tracer Kit Vybrant®	ThermoFisher Scientific Inc, Waltham (USA) #V12883
EasyPrep® Pro Plasmid Miniprep Kit	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf (Deutschland)
FoxP3 Staining Buffer Set	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland) # 130-093-142
Human IL-8 ELISA Set	BD Biosciences, San Jose (USA) #555244
NucleoBond® Xtra Midi	Marcherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren (Deutschland)
Treg Expansion Kit, human (anti-CD3/anti-CD28 Beads)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland) #130-095-345

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

Blockpuffer	5 % Magermilchpulver (w/v) in TBS-T
ELISA-Waschpuffer	PBS, 0.1% (v/v) Tween 20
FACS-Puffer	PBS, 0.5 mM NaN <sub>3</sub> , 1% (v/v) FKS
MTT-Lysepuffer	10% (w/v) SDS, 10 mM HCL
MCBL-Lysepuffer	NP40 0.5 % (v/v), 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4
RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 5 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerol, 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Protease Inhibitor (Roche Complete)
SDS-PAGE Laufpuffer	144 g Glycin (192 mM), 30 g Tris (250 mM), 10 g SDS (1%) ad 1 L H <sub>2</sub> O
2xSDS-PAGE Ladepuffer	125 mM Tris, 2% (w/v) SDS, 10 % (v/v) β-Mercapoethanol, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerol, 0.01 (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8
4xSDS-PAGE Ladepuffer	250 mM Tris, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol 0.004 % Bromphenolblau, 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)
TBS	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH7.4
TBS-T	TBS mit 0.1 % (v/v) Tween 20
Western Blot Transferpuffer	25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol

### 3.1.6 Zelllinien

TF-1: human, ATCC Nr.: CRL-2003; Ursprung: Erythroleukämie AML M6, erworben bei DMSZ (Braunschweig, Deutschland)

Ku812F: human, ATCC Nr.: CRL-2101; Ursprung: Chronische Myeloische Leukämie erworben bei LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland)

L929: murin, ATCC Nr.: CRL-6364, Ursprung: subkutanes lockeres Bindegewebe einer männlichen C3H/An Maus, erworben bei DMSZ (Braunschweig, Deutschland)

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Mononukleäre Zellen (PBMCs) wurden aus dem peripheren Blut von freiwilligen Spendern isoliert. Es wurde Blut von gesunden weiblichen und männlichen Spendern unterschiedlichen Alters zur Isolation der PBMCs verwendet.

Dabei wurde frisch entnommenes Blut mit PBS (inkl. 2 mM EDTA) vierfach verdünnt und über Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll, 400 g, 35 min) eine PBMC-haltige Fraktion isoliert. Durch einmaliges Waschen der Fraktion mit PBS (2 % FKS) und Zentrifugation bei 300 g / 10 min wurden Reste der Saccharose-Polymere entfernt. Nach erneutem zweimaligem Waschen (200 g, 10 min) mit PBS (inkl. 2 mM EDTA) zur Beseitigung von kontaminierenden Thrombozyten wurde die Zellzahl bestimmt und ein Großteil der PBMCs für die Anreicherung regulatorischer T-Zellen eingesetzt. Die übrigen Zellen wurden bei minus 80 °C in FKS (inkl. 10 % DMSO) weggefroren.

### 3.2.2 Isolation regulatorischer T-Zellen

Zur Anreicherung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) aus peripheren mononukleären Zellen wurde ein  $CD4^+CD25^+CD127^{dim/-}$  Regulatory T Cell Isolation Kit II (#130-094-775) von Miltenyi Biotec gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Isolation von Tregs aus dem Blut freiwilliger Spender wurde von der Ethik-Kommission der Universität Regensburg genehmigt (Az. 13-101-0243).

Bei diesem Verfahren wurden mit Hilfe von biotinylierten Antikörpern und anti-Biotin Microbeads zuerst alle CD19, CD8, CD123 und CD127-positiven Zellen über eine Magnetsäule depletiert. Dazu wurden PBMCs abzentrifugiert (300 g, 10 min) mit dem Antikörper-Cocktail (10 µl Antikörper und 40 µl Puffer (PBS, 2 mM EDTA, 0.5 % FKS) pro  $1 \times 10^7$  Zellen. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei 4°C, wurden 30 µl Puffer und 20 µl anti-

Biotin Microbeads pro  $1 \times 10^7$  Zellen zugegeben. Nach weiteren 10 Minuten bei 4 °C wurden die Zell-Bead Suspension auf eine gespülte magnetische LD-Säule gegeben. Die im Durchfluss enthaltenen  $CD4^+$  Zellen wurden gewaschen (300 g, 10 min), gezählt und mit 90 µl Puffer und 10 µl anti-CD25 Microbeads für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die  $CD4^+CD127^{dim/-}$  Zellpopulation, mit gebundenen anti-CD25 Microbeads auf eine zweite magnetische Säule (MS) gegeben. Über diese zweite magnetische MS-Säule wurden schließlich die  $CD25^+$  T-Zellen ( $CD4^+CD25^+CD127^{dim/-}$ ) aus dieser Zellsuspension angereichert. Abschließend wurden die  $CD4^+CD25^+CD127^{dim/-}$  Zellen gezählt und zur Expansion mit anti-CD3/anti-CD28 Beads und IL-2 (500 U/ml) stimuliert.

### 3.2.3 Zellkultur

Nach Isolation wurden regulatorische T-Zellen zur Expansion mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper gekoppelten, magnetischen Beads (Miltenyi Biotec, Bead-zu-Zell Ratio 4:1) und 500 U/ml IL-2 inkubiert. Als Kulturmedium wurde TexMACS Medium (Miltenyi Biotec) verwendet. Um kontaminierende, konventionelle T-Zellen an der Proliferation zu hintern, wurden magnetisch isolierte Treg-Zellkulturen zusätzlich mit 1 µM Rapamycin (Santa Cruz) versetzt.

Als Kulturmedium für humane TF-1 und Ku812F Zelllinien wurde RPMI Medium, für murine L929 Zellen DMEM Medium verwendet. Standardmäßig wurde Zellkulturmedium mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) versetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem HERA cell 240 Heraeus cell incubator (Heraeus instruments) kultiviert. Alle Zelllinien und primären Zellen wurden nach 2 bis 3 Tagen mit frischem Medium versorgt. Die Zellzahl in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

### 3.2.4 Aktivitätsmessung von Caspase-3/7

Die Aktivität von Caspase-3 und 7 wurde unter Verwendung eines Cell Meter™ Caspase 3 / 7 Activity Apoptosis Assay Kit (AAT Bioquest, Sunnyvale, USA) in technischen Duplikaten gemäß Herstellerprotokoll bestimmt. Die Fluoreszenz Emission wurde mit einem Victor3 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, USA) detektiert.

### 3.2.5 Durchflusszytometrie

Zur Detektion von DR3 auf der Zelloberfläche wurden  $1-5 \times 10^5$  Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für 10 min mit Fc-Receptor Blocking Reagenz (Miltenyi Biotec) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit polyklonalem, biotinyliertem DR3-spezifischen Antikörper oder biotinyliertem, unspezifischem Antikörper als Kontrolle für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C mit dem sekundären Antikörper gefärbt. Als sekundärer Antikörper diente sowohl FITC-konjugierter, biotinylierter  $\alpha$ -Ziege Antikörper (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA) als auch FITC-konjugiertes Avidin (R&D Systems). Abschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und am FACS Canto II Durchflusszytometer analysiert.

Die Detektion aller anderen Rezeptoren erfolgte mit spezifischen Antikörpern sowie deren Isotypkontrollen gemäß Herstellerprotokoll.

Die intrazellulären FoxP3 Färbungen wurden unter Verwendung eines FoxP3 Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec) gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

Für Durchflusszytometrie verwendete Antikörper:

Antigen	Wirt	Art	Konjugat/ Fluoreszenz- Farbstoff	Firma	Bestellnummer
DR3	Ziege	polyklonal	Biotin	R&D Systems	BAF943
CD127	Maus	IgG2a	FITC	Miltenyi Biotec	130-098-093
CD4 (VIT4)	Maus	IgG2a	FITC	Miltenyi Biotec	130-092-358
FoxP3	Maus	IgG1	APC	Miltenyi Biotec	130-093-013
TNFR1	Maus	IgG1	PE	R&D Systems	FAB225P
TNFR2	Maus	IgG2a	PE	R&D Systems	FAB226P
CD25	Maus	IgG1	PE	Miltenyi Biotec	130-091-024
CD3	Maus	IgG1	APC-Cy7	BioLegend	344818
CD8	Maus	IgG2a	APC	Miltenyi Biotec	130-091-076
Isotypkontr.	Ziege	IgG	Biotin	R&D Systems	BAF108
Isotypkontr.	Maus	IgG1	PE	BD Biosciences	551436
Isotypkontr.	Maus	IgG1	APC	BioLegend	400119
Isotypkontr.	Maus	IgG2a	FITC	Miltenyi Biotec	130-091-837
Isotypkontr.	Maus	IgG2a	PE	Miltenyi Biotec	130-091-835

**Tabelle 1.** Für Durchflusszytometrie verwendete Antikörper



### Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Intrazelluläre ROS Produktion wurde mit Hilfe des ROS sensitiven Farbstoffes CM-H2DCFDA (Invitrogen, Carlsbad, USA) gemessen. Dazu wurden Ku812F Zellen mit BV6 (3  $\mu\text{M}$ ), zVAD-fmk (100  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt (1 h) und anschließend mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) stimuliert. Für die letzten 30 min der Stimulationszeit wurde der zellpermeable Farbstoff CM-H2DCFDA (5  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und sofort am FACS Canto II Durchflusszytometer analysiert.

### Zelltodbestimmung mittels 7-AAD

Zur Analyse der Membranintegrität wurden Ku812F Zellen ( $2 \times 10^5$ ) mit BV6 (2 h, 3  $\mu\text{M}$ ) und zVAD-fmk (1 h, 100  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt und anschließend mit 200 ng/ml Flag-TNC-TL1A für 4 h in technischen Triplikaten stimuliert. Verschiedene Inhibitoren wurden 1 h vor Stimulation in folgender Konzentration zugegeben: Necrostatin-1 100  $\mu\text{M}$ , Necrostatin-1s 30  $\mu\text{M}$  und GSK'872 8  $\mu\text{M}$ . Die Färbung mit 7-AAD (R&D Systems) wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  für 30 min bei 4 °C mit 4  $\mu\text{l}$  7-AAD inkubiert. Nachfolgend wurden 300  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer zugegeben und die 7-AAD Inkorporation der toten Zellen sofort am FACS Canto II Durchflusszytometer analysiert.

### **3.2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

$7 \times 10^4$  TF-1 Zellen (in 0,2 ml Medium) wurden in Ab- oder Anwesenheit von zVAD-fmk (100  $\mu\text{M}$ ) mit unterschiedlichen Konzentrationen an TNF-Liganden für 6h oder 7 h in Triplikaten stimuliert. Die Überstände wurden mittels IL8 ELISA (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) und einem BioRad Microplate Reader Model 680 quantifiziert.

### **3.2.7 siRNA Experimente**

RIP3 spezifische siRNA Oligonukleotide (SMARTpool#M-003534-01) wurden bei Dharmacon (Lafayette, USA) gekauft. Unspezifische (*non-target*) siRNA Oligonukleotide von Qiagen (Hilden, Deutschland) dienten als Kontrolle.  $1.5 \times 10^6$  Ku812F Zellen wurden dreimal in Opti-MEM Medium gewaschen und mit 400 pM siRNA Oligonukleotiden für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde eine Elektroporation unter 300 V, 150  $\mu\text{F}$  und 100  $\Omega$  mit einem BioRad Gene Pulser Xcell<sup>TM</sup> Gerät durchgeführt. Die Knock-Down Effizienz und die Zytotoxizitätsassays wurden 48 h nach Elektroporation überprüft bzw. durchgeführt.

### 3.2.8 Mikroskopie

$4 \times 10^4$  Ku812F Zellen pro Well wurden in einer 96-Well Platte ausgesät und mit BV6 (2 h, 3  $\mu$ M) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M) inkubiert. Zusätzlich wurden Inhibitoren Necrostatin-1 (100  $\mu$ M) und Necrosulfonamid (25  $\mu$ M) eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) für 3 h stimuliert und die Zellmorphologie mittels Hellfeld-mikroskopie an einem Keyence BZ9000 Mikroskop (Keyence, Osaka, Japan) analysiert.

### 3.2.9 Zytotoxizitätsassay

TF-1 ( $7 \times 10^4$  Zellen pro Well), Ku812F ( $5 \times 10^4$  Zellen pro Well) und L929 Zellen ( $1 \times 10^4$  Zellen pro Well) wurden in eine 96-Well Platte ausgesät und mit CHX (2 h, 2.5  $\mu$ g/ml) oder BV6 (2 h, TF-1 10  $\mu$ M; Ku812F 3  $\mu$ M; L929 2.5  $\mu$ M) inkubiert. Verschiedene Inhibitoren wurden 1 h vor Stimulation in folgender Konzentration zugegeben: zVAD-fmk 100  $\mu$ M, Necrostatin-1 100  $\mu$ M, Necrostatin-1s 30  $\mu$ M, GSK‘872 8  $\mu$ M, Necrosulfonamid 25  $\mu$ M und Butylhydroxylansiol 100  $\mu$ M. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Liganden (meist in unterschiedlicher Konzentration, erreicht durch sequentiellen Verdünnung) in technischen Triplikaten stimuliert. Das Zellüberleben wurde 4 oder 18 h nach Stimulation über MTT-Färbung (2 h bei 37 °C) bestimmt. Nach Lyse der Zellen in MTT-Lysepuffer (10 % SDS, 0.1 M HCL) wurde die OD<sub>595</sub> mit Hilfe eines BioRad Microplate Reader Model 680 ausgelesen und das prozentuale Überleben der Zellen berechnet.

### 3.2.10 Suppressions-Assay

Im Suppression-Assay wurde die Funktionalität von Tregs untersucht. Dabei wurde die Inhibition von CD8<sup>+</sup> T-Zell Proliferation als Maß für die Suppressivität der Tregs analysiert. Die Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde über einen CFDA-SE Cell Tracer Kit (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham (USA)) gemessen. Prinzip dabei ist, dass initial eine Zellpopulation mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE (Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester) gefärbt wird. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff aufgeteilt, was zu einer Halbierung des Fluoreszenz-Signals pro Zellteilung führt. Somit kann über die Abnahme des Fluoreszenz-Signals die Proliferation von Zellen beispielsweise über Durchflusszytometrie beobachtet werden.

Nach erfolgter Treg-Expansion über 14 Tage wurden die Zellen für 2-4 Tage ohne anti-CD3/anti-CD28 Stimulation und IL-2 inkubiert. Autologe PBMCs, weggefroren am Tag der Treg-Isolation, wurden 24 h vor Beginn des Suppression-Assays aufgetaut.

Die PBMCs wurden abzentrifugiert (300 g, 5 min) und in 2 ml warmem PBS aufgenommen. Dann wurden 2 ml PBS inkl. 5  $\mu$ M CFDA SE zugegeben und die Zellen für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in Medium gewaschen und anschließend erneut für 30 min bei

37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Medium wurde die PBMC-Zellsuspension auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt.

Die Treg-Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. In das erste Well wurden 100 µl bzw.  $1 \times 10^5$  Tregs pipettiert und damit eine sequentielle Verdünnungsreihe mit Medium (Verhältnis 1:2) angesetzt. Zu den Tregs wurden im Anschluss je 50 µl (bzw.  $1 \times 10^5$  Zellen) der PBMC-Zellsuspension gegeben. Danach wurden gewaschene anti-CD3/anti-CD28 Microbeads (Volumen 100 µl, Bead-zu-Zell Ratio 5:1) in jedes Well pipettiert. Als Kontrolle für maximale Proliferation wurden PBMCs in Abwesenheit von Tregs mit den anti-CD3/anti-CD28 Microbeads stimuliert. Außerdem wurden PBMCs in Abwesenheit von Tregs und anti-CD3/anti-CD28 Microbeads inkubiert.

Nach 4 Tagen Inkubationszeit bei 37 °C wurde der Suppression-Assay mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Dazu wurden die anti-CD3/anti-CD28 Microbeads magnetisch entfernt und die Co-Kultur aus PBMCs und Tregs zur Detektion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels anti-CD3-APC/Cy7 und anti-CD8-APC gefärbt. Die Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden über das CFSE Signal am FACS Canto II Durchflusszytometer analysiert. Die Berechnung der prozentualen Inhibition wurde mit Hilfe der FlowJo FACS Analysesoftware (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA) unter Verwendung der Divisionsindex-Methode durchgeführt [164].

### 3.3 Proteinanalytische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

##### Lyse mit Triton X-100 haltigem Lysepuffer zur Detektion zytoplasmatischer Proteine

Zellen wurden einmal mit kaltem PBS auf Eis gewaschen, in ein Eppendorf Tube überführt und anschließend in RIPA-Lysepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 5 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerol, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) aufgenommen. Zusätzlich wurde der RIPA-Lysepuffer mit Roche complete<sup>TM</sup> protease inhibitor cocktail versetzt. Die Zellen wurden und für 40 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen für 20 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und vom Lysat 5 µl für die Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen. Das Lysat wurde mit einer äquivalenten Menge 4 x Laemmli-Puffer für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und schließlich bei minus 20 °C bis zur SDS-PAGE aufbewahrt.

##### Herstellung von Gesamtzelllysaten zur Detektion phosphorylierter Proteine

Zellen wurden einmal mit kaltem TBS (supplementiert mit 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) auf Eis gewaschen (400 g, 3 min), in ein Eppendorf Cup überführt und anschließend in 4 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Um eine mögliche Dephosphorylierung von Proteinen zu verhindern wurde der Puffer zusätzlich mit dem Phosphatase Inhibitor Cocktail-I und -II (Sigma-Aldrich) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei 95 °C wurden die Proben für 5 min mit Hilfe eines Branson Sonifier 450 sonifiziert und anschließend mittel SDS-PAGE analysiert.

#### 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Messung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde ein BSA Protein Assay Kit von ThermoFisher Scientific verwendet. Dabei wurde Reagenz A mit Reagenz B im Verhältnis 50:1 gemischt. 5 µl der Zelllysate wurden mit 20 µl H<sub>2</sub>O auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 200 µl Reagenz A / Reagenz B hinzugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C. Schließlich konnte anhand eines BSA Standards mit einem Smart spec<sup>TM</sup> plus Sepctrophotometer die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden. Die Adsorption wurde bei Raumtemperatur und 595 nm gemessen.

### 3.3.3 Immunpräzipitation

Bei einer Immunpräzipitation (IP) wird mittels eines Antikörpers ein bestimmtes Antigen aus einer Lösung / einem Zelllysats aufkonzentriert. Die Antikörper werden mit gebundenen Antigenen über Protein-G Agarose Beads aus der Lösung gefischt. Das Protein G auf den Agarose Beads stammt ursprünglich aus der Bakterienzellwand der Gattung *Streptococcus* und weist eine hohe Affinität für den Fc-Teil von IgG-Antikörpern auf. Auf diese Weise kann über die Bindung Agarose Beads-Protein-G-Antikörper-Antigen das gesuchte Antigen angereichert und Bindungspartner oder Modifikationen identifiziert werden.

Für Immunpräzipitationsexperimente wurden TF-1 Zellen ( $1 \times 10^8$  pro Kondition) mit HA-Flag-TNC-TL1A bei 37 °C für die angegebene Zeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kalt gewaschen und für 20 min auf Eis lysiert (30 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 % Triton X-100, 10% Glycerol, 120 mM NaCl, 1 x Roche complete<sup>TM</sup> protease inhibitor cocktail). Die Lysate wurden bei 4 °C und 20000 g für 20 min zentrifugiert. HA-Flag-TNC-TL1A/ DR3 Komplexe wurden über anti-HA Antikörper, gekoppelt auf Agarose Beads (Sigma Aldrich), bei 4 °C über Nacht präzipitiert.

Ku812F Zellen ( $1-2 \times 10^7$  pro Kondition) wurden mit BV6 (2 h, 3  $\mu$ M) und zVAD-fmk (1 h, 100  $\mu$ M) vorbehandelt. Dann wurden die Zellen mit Flag-TNC-TL1A (RIP3 und Caspase-8 IP 400 ng/ml; Flag IP 1  $\mu$ g/ml) für die angegebenen Zeitspannen stimuliert. Nach einmaligem Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen in 600  $\mu$ l MCBL-Lysepuffer (NP40 0.5 % (v/v), 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4), versetzt mit Roche complete<sup>TM</sup> protease inhibitor cocktail, aufgenommen und für 40 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden bei 4 °C und 20000 g für 20 min zentrifugiert, das Pellet verworfen und die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt. 1,5 mg Proteinlysats wurden über Nacht bei 4 °C mit 2  $\mu$ g  $\alpha$ -Caspase-8 oder  $\alpha$ -RIP3 Antikörper oder 1  $\mu$ g  $\alpha$ -Flag Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Antikörper-Antigen Komplexe mittels Protein-G Agarose Beads präzipitiert.

Anschließend wurden die Protein-G Agarose Beads oder HA-Agarose Beads mehrmals mit 800  $\mu$ l Lysepuffer gewaschen und die Proteinkomplexe durch Inkubation mit Laemmli-Puffer bei 95 °C (10min) von den Agarose Beads eluiert. Schließlich wurden die Immunpräzipitate zusammen mit den korrespondierenden Lysatfraktionen mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

### 3.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode um Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Um die Sekundärstruktur und die Tertiärstruktur von Proteinen zu zerstören, wurden die Proben bei 95 °C in Laemmli-Puffer aufgeköcht und dadurch denaturiert. Das im Puffer enthaltene anionische Tensid SDS (*sodium dodecyl sulfate*) lagert sich gleichmäßig an Proteine an und verleiht somit eine negative Ladung. Die Abstoßung der negativen Ladung trägt ebenfalls zur Linearisierung eines Proteins bei. Außerdem spaltet  $\beta$ -Mercaptoethanol durch Reduktion die Disulfidbrücken der Proteine.

Zusätzlich enthält der Laemmli-Puffer Glycerin und Bromphenolblau um das Auftragen der Proben zu erleichtern.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein SDS-Polyacrylamidgel und das Anlegen eines elektrischen Feldes. Durch die Denaturierung und die einheitliche negative Ladung konnten Proteine durch ein SDS-Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Bei der Migration durch das Gel in Richtung Anode wurden dann größere Proteine stärker zurückgehalten als kleine Proteine wodurch die Auftrennung erfolgt. Ein Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Die Proben wurden auf das Sammelgel aufgetragen, wo die Proteine nach Anlegen eines elektrischen Feldes bei neutralem pH ankonzentriert wurden. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Proteine bei Erreichen des Trenngels vom gleichen Startpunkt aus durch das basische Trenngel wanderten. Die Gelelektrophorese wurde bei 25 mA pro Gel und 200 V durchgeführt. Für die Gelelektrophorese wurde ein Mini PROTEAN Tetra System der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH verwendet. Im Anschluss an die SDS-PAGE folgte ein Westernblot.

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach folgender Rezeptur gegossen, wobei der Acrylamid Anteil je nach Größe des zu detektierenden Proteins zwischen 8-15 % lag.

<b>Trenngel (10 % Acrylamid)</b>	<b>Volumen (20 ml)</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>Volumen (5ml)</b>
H <sub>2</sub> O	7.9 ml	H <sub>2</sub> O	3.4 ml
30 % Acryl-Bisacrylamid Mix	6.7 ml	30 % Acryl-Bisacrylamid Mix	830 µl
1.5 M Tris (pH 8.8)	5.0 ml	1.5 M Tris (pH 6.8)	630 µl
10% SDS	200 µl	10% SDS	50 µl
10 % APS	200 µl	10 % APS	50 µl
TEMED	8 µl	TEMED	5 µl

**Tabelle 2.** Rezeptur eines SDS-Polyacrylamidgels

### 3.3.5 Westernblot-Analyse und immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid Membran (0,2 µm) transferiert. Die PVDF Membran wurde zuerst in Methanol äquilibriert und danach zusammen mit zusammen mit Whatman Papers, Sandwich Pads und dem Polyacrylamidgel in Transferpuffer gelegt. Dann wurde die Blot-Kassette gemäß Herstellerangabe zusammengebaut. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (350 mA, 100 V, 1 h) konnten die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die PVDF Membran transferiert werden. Für den Westernblot wurden Tank-Blotter der Firma PEQLAB verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran für mindestens 1 h in TBS-T mit 5 % Milchpulver gelegt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nachfolgend wurde die Membran kurz in TBS-T gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem spezifischen Antikörper gegen das nachzuweisende Protein inkubiert. Die primären Antikörper wurden in Roti®-block (in TBS-

T) verdünnt. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal in TBS-T gewaschen und dann mit einem sekundären, HRP (*horseradish peroxidase*) -gekoppelten Antikörper für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden ebenfalls in Roti®-block (in TBS-T) verdünnt. Schließlich wurde die Membran dreimal in TBS-T gewaschen. Die Membran wurde nach dem letzten Waschschrift für 5 min mit ECL Western Blot Substrat-Lösung (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate) inkubiert. Die Chemilumineszenz-Signale wurden unmittelbar danach mittels einer Charge-Coupled Device-Kamera (INTAS Chemilux Pro) visualisiert. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit den Software-Programmen ImageJ und Adobe Illustrator Version CS2.

Für Westernblot verwendete Antikörper:

Erstantikörper			Zweitantikörper		
Name/ Antigen	Hersteller/ Bestellnummer	Verdünnung	Name	Her- steller	Verd- ünnng
$\alpha$ -cIAP1	Cell Signaling #4952	1:1000	Goat anti-rabbit-IgG HRP-conjugate	Bio-Rad #172-1019	1:3000
$\alpha$ -cIAP2	Abcam #ab23423	1:1000			
$\alpha$ -Caspase-3	Cell Signaling #9662	1:1000			
$\alpha$ -ERK1/2	Cell Signaling #4695	1:1000			
$\alpha$ -p-ERK1/2	Cell Signaling #4370	1:1000			
$\alpha$ -IKB $\alpha$	Cell Signaling #4812	1:1000			
$\alpha$ -p-IKB $\alpha$	Cell Signaling #2859	1:1000			
$\alpha$ -JNK	Cell Signaling #9258	1:1000			
$\alpha$ -p-JNK	Cell Signaling #9251	1:1000			
$\alpha$ -p38	Cell Signaling #9212	1:1000			
$\alpha$ -p-p38	Cell Signaling #9211	1:1000			
$\alpha$ -RIP3	Cell Signaling #13526	1:1000			
$\alpha$ -p100/52	Cell Signaling #4882	1:1000			
$\alpha$ -MLKL	MERCK #17-10400	1:1000			
$\alpha$ -p-MLKL	MERCK #17-10401	1:1000			
$\alpha$ -GAPDH	Abcam #ab9484	1:1000	Goat anti-mouse-IgG HRP-conjugate	Bio-Rad #170-6516	1:3000
$\alpha$ -Tubulin	Dunnlab #MS-581	1:2000			
$\alpha$ -Caspase-8	Cell Signaling #9746	1:1000			
$\alpha$ -RIP1	R&D #610459	1:1000			
$\alpha$ -Flag (M2)	Sigma-Aldrich#F-3165	1:4000			

**Tabelle 3.** Für Westernblot verwendete Antikörper

### 3.3.6 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Liganden der TNF Familie

Die fertigen Expressionsplasmide der TL1A Varianten (Flag-TNC-TL1A, Fc-Flag-TNC-TL1A, GpL-Flag-TNC-TL1A) wurden durch Harald Wajant (Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide sind Varianten des pCR3 Vektors (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Sie enthalten ein Ig Signalpeptid (bereitgestellt durch P. Schneider, Institut für Biochemie, Universität Lausanne, Schweiz), an das eine Flag-TNC Domäne angehängt wurde [159]. Zur Erstellung des Flag-TNC-TL1A Konstrukts wurden ein TL1A Amplikon (aa 92-251, inkl. Stop-Codon) an die Flag-TNC Domäne kloniert. Die Fc-Flag-TNC-TL1A Variante wurde durch Insertion von Flag-TNC-TL1A in einen pCR3 Vektor, der die humane IgG1 Fc Domäne enthielt und von P. Schneider zur Verfügung gestellt wurde, generiert. Die HA-Markierung (YPYDVPDYA) wurde über Klonierung von Gertrud Knoll (Universitätsklinikum Regensburg) N-terminal an Flag-TNC-TL1A angehängt. Der TNFR2-spezifische Agonist Flag-TNC-scTNF(143N/145R) wurde ebenso wie der TNFR1-spezifische Agonist Flag-TNF(32W/86T) von Harald Wajant bereitgestellt.

Zur Produktion von TNF Liganden wurden  $7.5 \times 10^6$  HEK 293T Zellen pro 15 cm Schale in 20 ml DMEM (10 % FKS) ausgesät. Am nächsten Tag wurden 5 ml Medium abgenommen. In einem Eppendorf Cup wurden 25 µg Plasmid DNA mit 63 µl Polyethylenimin in 1 ml DMEM (ohne FKS) gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionslösung wurde anschließend tröpfchenweise auf der bewachsenen 15 cm Schale verteilt. Nach 6 h wurde das Medium in der Schale gegen DMEM (0.5 % FKS) ausgetauscht. Die Ernte des Überstandes erfolgte nach 48 h. Es wurden nochmals 15 ml frisches DMEM (0.5 % FKS) zugegeben und nach weiteren 24 h erneut der Überstand geerntet. Die produzierten Liganden in den Zellkulturüberständen wurden mit Hilfe eines JumboSept Filters (Pall Corporation, MWCO 10 kDa) und Zentrifugation (3000 g / 35 min) ankonzentriert. Das Konzentrat wurde sterilfiltriert und über Westernblot eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

Die Aufreinigung der TNF Liganden aus Zellkulturüberstand erfolgte über den Flag-Proteintag mittels Affinitätschromatographie. Dazu wurden 2 ml (50 % Slurry) anti-Flag M2-Affinity-Gel (Sigma-Aldrich, A2220) mit 3 ml Gycin (0.1 M, pH 3.5, 3000 g für 5 min) und Tris (pH 7.5, 20-faches Säulenvolumen) gewaschen und in eine Einwegsäule (Quiagen, 5 ml) gegeben. Dann wurde das Konzentrat (max. 600 µg aufzureinigendes Protein, pH 7.3-7.5, plus 100 mM NaCl) auf 1 ml anti-Flag M2-Affinity-Gel gegeben. Nachdem das Konzentrat über die Säule gelaufen war, wurde mit 10-20 ml Tris (pH 7.5) gewaschen und ein Aliquot des letzten Waschschrittes aufbewahrt. Nun wurde die Säule bei geschlossenem Auslauf mit 5 ml Tris pH 7.5 inkl. Flag-Peptid (100 µg/ml) für 15 min inkubiert. Anschließend wurde der Auslauf geöffnet und die Eluat-Fraktionen zu 250 µl Aliquots in Eppendorf Cups aufgefangen. Die Aliquots wurden im Silbergel auf Reinheit und angereicherte Proteinmenge des produzierten Liganden überprüft und die entsprechenden Fraktionen vermengt. Es folgte eine Dialyse des Eluats in PBS über Nacht um restliches Flag-Peptid zu beseitigen. Zuletzt wurden die dialysierten Eluat-Fraktionen sterilfiltriert, mittels SDS-PAGE und Westernblot eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt, die Reinheit erneut im Silbergel überprüft und die Bioaktivität des Liganden mittels Zytotoxizitätsassay oder ELISA analysiert.



### 3.3.7 Silberfärbung

Zur Reinheitskontrolle wurden produzierte TNF Liganden mittels Silberfärbung untersucht. Dazu wurden die eluierten Liganden mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 15 min fixiert (50 % Methanol, 10 % reine Essigsäure, 40 % demineralisiertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O)). Nach dreimaligem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel für 15 min in ddH<sub>2</sub>O geschwenkt. Dann wurde das Gel mit 5 µg/ml DTT in ddH<sub>2</sub>O für 15 min reduziert. Nach erneutem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel für 15 min in 0.1 % Silbernitrat gefärbt und anschließend gewaschen. Im finalen Schritt wurden die Silberionen, welche sich durch die Färbung an den negativ geladenen Seitenketten der Proteine angelagert hatten, mittels Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert. Dazu wurde das Gel in 100 ml Entwicklungslösung (3 % Natriumcarbonat, 150 µl Formaldehyd (37 %) in ddH<sub>2</sub>O) geschwenkt. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Entwicklungslösung abgegossen und durch 10 % Essigsäure ersetzt. Abschließend wurde das Gel dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Untersuchungen zur TL1A-vermittelten DR3-Aktivierung**

#### **4.1.1 Produktion und Charakterisierung von löslichem TL1A**

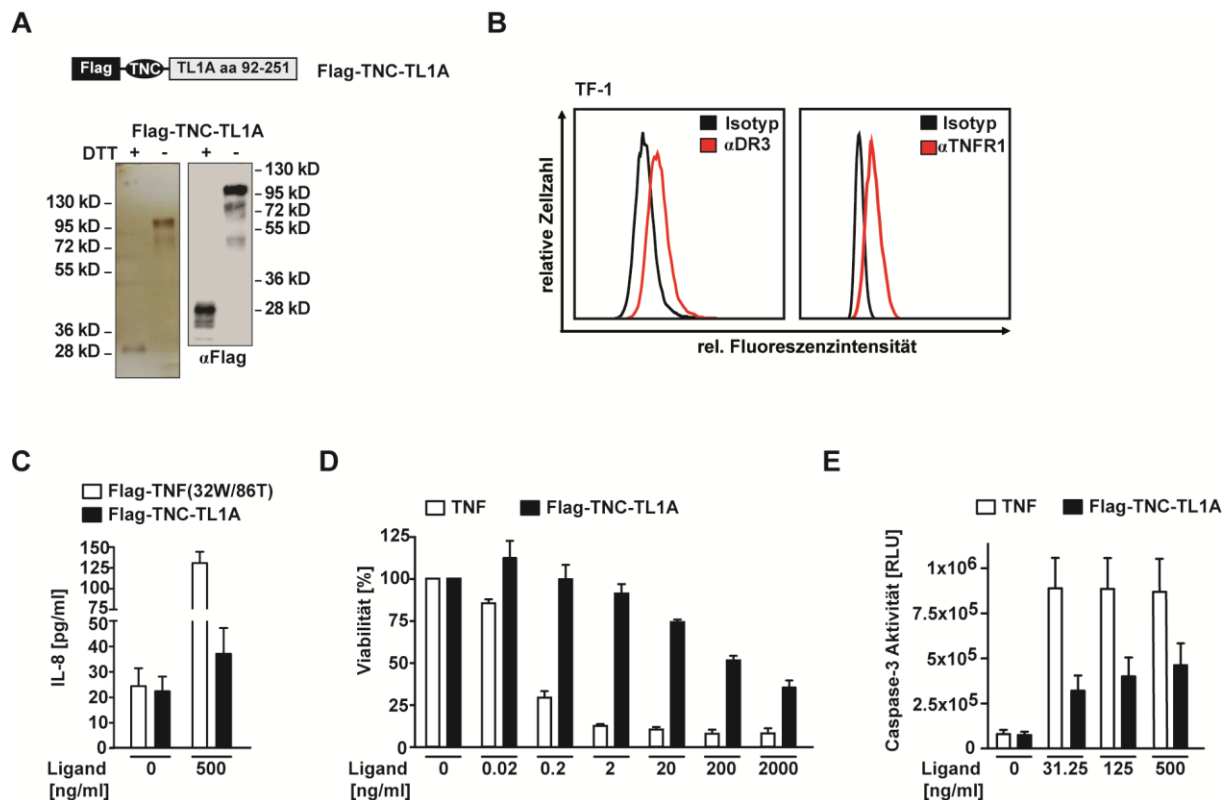
Die meisten Liganden der TNF-Familie werden membranständig exprimiert und können in dieser Form auch ihren zugehörigen Rezeptor effektiv aktivieren. Es werden aber auch lösliche timere Liganden über alternatives Spleißen oder durch proteolytische Spaltung generiert. Das Aktivierungspotenzial dieser löslichen Liganden, die sich aufgrund ihrer THD zu Trimeren zusammenlagern, variiert allerdings sehr stark. Trotz Bindung an den Rezeptor, können oftmals lösliche Liganden den gebundenen Rezeptor nicht aktivieren [7-9]. Ob Unterschiede in der DR3 Aktivierung durch lösliches oder membrangebundenes TL1A bestehen, wurde bislang nicht analysiert.

Zur Untersuchung der TL1A-induzierten DR3 Aktivierung wurde eine TL1A-Variante verwendet, die sowohl eine N-terminalen Flag-Markierung (D-Y-K-D-D-D-D-K) und die THD (aa 92-251) als auch eine Tenascin C Domäne (TNC) aus Huhn enthielt (siehe Abbildung 3 A). Der Flag-Tag erlaubt die Aufreinigung des Konstrukts mittels Affinitätschromatographie und sekundäre Antikörper-vermittelte Oligomerisierung. Die sekundäre Oligomerisierung über einen  $\alpha$ -Flag Antikörper (Klon M2) ahmt die membranständige Ligandenform nach und verstärkt die zelluläre Antwort im Falle von CD95 oder TRAILR1/2 beispielsweise um das 100-1000-fache [9, 165]. Die 30 aa kleine TNC Domäne sorgt über kovalente Bindungen für eine kompakte und stabile Trimerisierung von TNF Liganden und verhindert die Bildung hochmolekularer Aggregate. Dies erwies sich in der Vergangenheit als nützliche Instrument zur Stabilisierung trimerer TNF Liganden [8, 165]. Das fertig klonierte Konstrukt wurde von Prof. Dr. Harald Wajant (Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Der Ligand Flag-TNC-TL1A wurde in HEK 293T Zellen exprimiert und über anti-Flag Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Silberfärbung (Abbildung 3 A, links) und Westernblot-Analyse (Abbildung 3 A, rechts) demonstrierten die Trimerisierung des Konstrukts unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Der Großteil des Produkts wanderte unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE auf einer Höhe, die mit dem Molekulargewicht eines Trimers übereinstimmte. Um die trimeren Moleküle zu Monomeren zu vereinzeln, wurde außerdem reduzierendes Dithiothreitol (DTT) zugegeben. Dies hatte eine dominante Bande auf einer Höhe von ca. 28 kDa in der SDS-PAGE zur Folge. Das Auftauchen von einigen etwas schneller laufenden Banden im SDS-Polyacrylamidgel deutete auf Glykosylierung des Konstrukts hin. Glykosylierung ist eine häufig beobachtete Modifikation bei TNF Liganden. Das Molekulargewicht des produzierten trimeren Liganden wurde zudem mittels Größenausschluss-Chromatographie verifiziert (Daten nicht gezeigt).

DR3 kann, ähnliche wie TNFR1, apoptotische und nicht-apoptotische Signalwege induzieren [130]. Als Modell zur Untersuchung dieser Signalwege wurde die Erythroleukämie-Zelllinie TF-1 gewählt, die sowohl DR3 als auch TNFR1 auf der Zelloberfläche exprimiert (Abbildung 3 B). Um die pro-inflammatorische Signalantwort zu untersuchen, wurden die Zellen für 7 h mit dem trimeren Flag-TNC-TL1A oder einer TNFR1-spezifischen TNF-Variante (Flag-TNF(32W/86T)) [166] inkubiert.

Interessanterweise wurden bei der Quantifizierung von IL-8, einem NF $\kappa$ B Zielgen, im Überstand der Zellen erhebliche Unterschiede der induzierten IL-8 Menge festgestellt. Während die IL-8 Sekretion der Zellen nach TNFR1 Stimulation stark anstieg, war die DR3-vermittelte Induktion deutlich geringer (Abbildung 3 C). Eine zusätzliche Aktivierung von NF $\kappa$ B über TNFR2 konnte durch die Verwendung der TNFR1-spezifischen TNF-Variante ausgeschlossen werden.



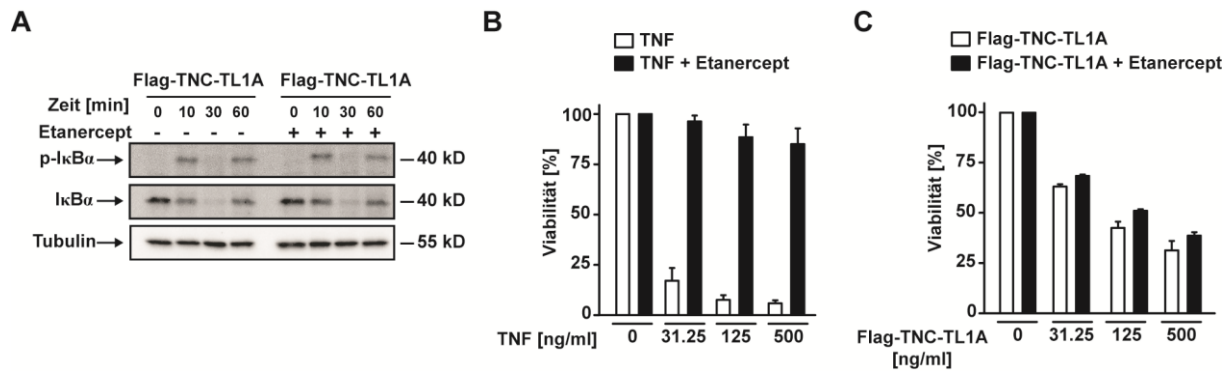
**Abbildung 3.** Zelltod-Induktion und NF $\kappa$ B-Aktivierung durch lösliches TL1A und TNF.

A) Oben: Schema des verwendeten Flag-TNC-TL1A Konstrukts. Unten: Flag-TNC-TL1A wurde in HEK 293T Zellen produziert, über anti-Flag Affinitätschromatographie aufgereinigt, über SDS-PAGE unter reduzierenden (2 mM DTT) und nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Silberfärbung (links) und anti-Flag Westernblot (rechts) analysiert. B) Die Oberflächenexpression von DR3 und TNF wurde auf TF-1 Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. C) TF-1 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A oder TNFR1-spezifischem Agonisten (Flag-TNF(32W/86T)) für 7 h stimuliert. Die IL-8 Konzentrationen der Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (*Standard Error of the Mean*) von drei durchgeführten Experimenten. D) Die Zellen wurden für 2 h mit Cycloheximid (2.5  $\mu$ g/ml) behandelt, anschließend mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A oder TNF für 18 h stimuliert. Die Auswertung erfolgte über MTT-basierte Viabilitätsmessung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. E) TF-1 Zellen wurden für 2 h mit Cycloheximid (2.5  $\mu$ g/ml) behandelt und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A oder TNF für 3 h stimuliert. Caspase-3 Aktivität wurde über Zugabe eines fluorogenen Substrates ((zDEVD)-R-110) gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. RLU: *relative light units*

Da DR3 und TNFR1 naturgemäß in der Regel zuerst anti-apoptotische Signalwege aktivieren, müssen Zellen zur experimentellen Untersuchung der apoptotischen Signalwege gegenüber Zelltod sensitiviert werden. Durch Zugabe von Cycloheximid (CHX) wurde die Translation der Zellen und damit deren „später Checkpoint“ (siehe 2.1.3) inhibiert. Anschließend wurden die Zellen mit Flag-TNC-TL1A oder TNF über 18 h stimuliert. Die Zelltod-Induktion durch Flag-TNC-TL1A war ebenfalls bedeutend geringer als durch TNF (Abbildung 3 D). Selbst hohe Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A führten zu keinem kompletten Absterben der Zellen. Die letale Dosis des Liganden, bei der 50 Prozent der Zellen starben ( $LD_{50}$ ), lag für TNF bei 0.54 ng/ml (95 % Konfidenzintervall, 0.38-0.71 ng/ml). Für Flag-TNC-TL1A hingegen ergab sich eine  $LD_{50}$  von 1740 ng/ml (95 % Konfidenzintervall, 1660-1812 ng/ml). Die Aktivität der Effektorcaspase-3 nach CHX/Flag-TNC-TL1A und CHX/TNF Stimulation korrelierte mit der im Zytotoxizitätsassay beobachteten Zellviabilität und ist gleichzeitig Beleg für apoptotischen Zelltod (Abbildung 3 E). Diese drastischen Unterschiede von TL1A und TNF bzgl. NF $\kappa$ B Aktivierung und  $LD_{50}$  waren erstaunlich, da die zugehörigen Rezeptoren laut Literatur ähnliche intrazelluläre Signalkomplexe und Signalwege aktivieren [127, 167].

Der moderate zytotoxische Effekt der Flag-TNC-TL1A Stimulation erinnerte an *TNF-like weak inducer of apoptosis* (TWEAK), einen anderen Liganden der TNF Familie. Seinem Namen entsprechend, ist dieser Ligand kaum in der Lage Zelltod auszulösen. Interaktion von TWEAK mit seinem Rezeptor Fn14 führt in einigen Zelllinien über NF $\kappa$ B Aktivierung zu Sekretion von TNF. TNF induziert daraufhin autokrin Apoptose über TNFR1 [168]. Um daher etwaige indirekte, TNF-abhängige Effekte im experimentellen System ausschließen zu können, wurde die NF $\kappa$ B Aktivierung und Apoptose-Induktion in Anwesenheit von Etanercept, einem TNFR2-Fc Fusionskonstrukt zur TNF Neutralisation, untersucht. Übereinstimmend mit der beschriebenen IL-8 Induktion aus Abbildung 3 C, induzierte die Stimulation der Zellen mit Flag-TNC-TL1A Phosphorylierung und Degradation des NF $\kappa$ B Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  (Abbildung 4 A). Die Anwesenheit von Etanercept hatte keinen Einfluss auf Phosphorylierung und Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ . Erwartungsgemäß konnte die Vorbehandlung mit Etanercept TF-1 Zellen vor TNF-vermitteltem Tod schützen (Abbildung 4 B). Demgegenüber blieb der zytotoxische Effekt der Flag-TNC-TL1A Stimulation unbeeinflusst (Abbildung 4 C).

Zusammenfassend zeigen die Daten aus Abbildung 3 und 4, dass das produzierte und aufgereinigte trimere Flag-TNC-TL1A Bioaktivität aufweist und die Flag-TNC-TL1A-vermittelten Effekte in TF-1 Zellen unabhängig von autokriner TNF Sekretion sind. Die Bioaktivität des Liganden erscheint im Hinblick auf Apoptose-Induktion und NF $\kappa$ B Aktivierung, verglichen mit TNF, gering. Ob DR3 zur vollen Aktivierung, ähnlich wie andere TNF Rezeptoren, die Bindung eines höher oligomerisierten Liganden benötigt, sollte im Folgenden untersucht werden.



**Abbildung 4.** Zelltod-Induktion und NFκB Aktivierung sind unabhängig von autokriner TNF Sekretion

A) TF-1 Zellen wurden in Ab- und Anwesenheit von Etanercept (50 μg/ml) über die angegebenen Zeitspannen mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, lysiert und mittels spezifischer Antikörper im Westernblot analysiert. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle. B) und C) TF-1 Zellen wurden für 2 h mit CHX (2.5 μg/ml) behandelt und anschließend für 18 h mit TNF (B) oder Flag-TNC-TL1A (C) in den angegebenen Konzentrationen in Ab- und Anwesenheit von Etanercept (1 mg/ml) inkubiert. Die Auswertung erfolgte über MTT-basierte Viabilitätsmessung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei durchgeführten Experimenten.

#### 4.1.2 Trimeres TL1A birgt vollständiges Aktivierungspotenzial für DR3

Die Oligomerisierung von TNF Liganden kann starken Einfluss auf deren Rezeptor-aktivierungspotenzial haben. Da für TL1A bislang keine Daten diesbezüglich vorlagen, stellte dies eine mögliche Erklärung dar, warum die Effekte durch trimeres TL1A, verglichen mit TNF, eher moderat waren (Abbildung 3). Im Hinblick auf mögliche therapeutische Anwendungen von TL1A, beispielsweise TL1A/DR3-induzierte Treg- Expansion (siehe 2.4), und auf alle weiteren Experimente des Projekts war und ist die Erhebung dieser Daten essentiell.

Zuerst wurde der Einfluss der TL1A-Oligomerisierung auf zytotoxische Effekte des Todesrezeptors untersucht. Dazu wurde Flag-TNC-TL1A über einen anti-Flag Antikörper (Klon M2) quervernetzt und im Zytotoxizitätsassay mit trimerelem Flag-TNC-TL1A verglichen. Dabei handelt es sich um eine etablierte Methode zur Nachahmung membranständiger bzw. oligomerisierter TNF Liganden [14]. Die Zelltod-Induktion in TF-1 Zellen blieb trotz Quervernetzung von Flag-TNC-TL1A unverändert (Abbildung 5 A). Im Gegensatz dazu wurde die Zelltod-Induktion durch die Quervernetzung von trimerelem Flag-TRAIL erwartungsgemäß drastisch verbessert (Abbildung 5 B). Dieser parallele Ansatz diente gleichzeitig als Positivkontrolle um ineffiziente Quervernetzung als Grund für schwache zytotoxische Effekte (im Falle von Flag-TNC-TL1A) auszuschließen. Die Inkubation der Zellen ausschließlich mit dem M2-Antikörper hatte keine Auswirkung auf die Zellviabilität.

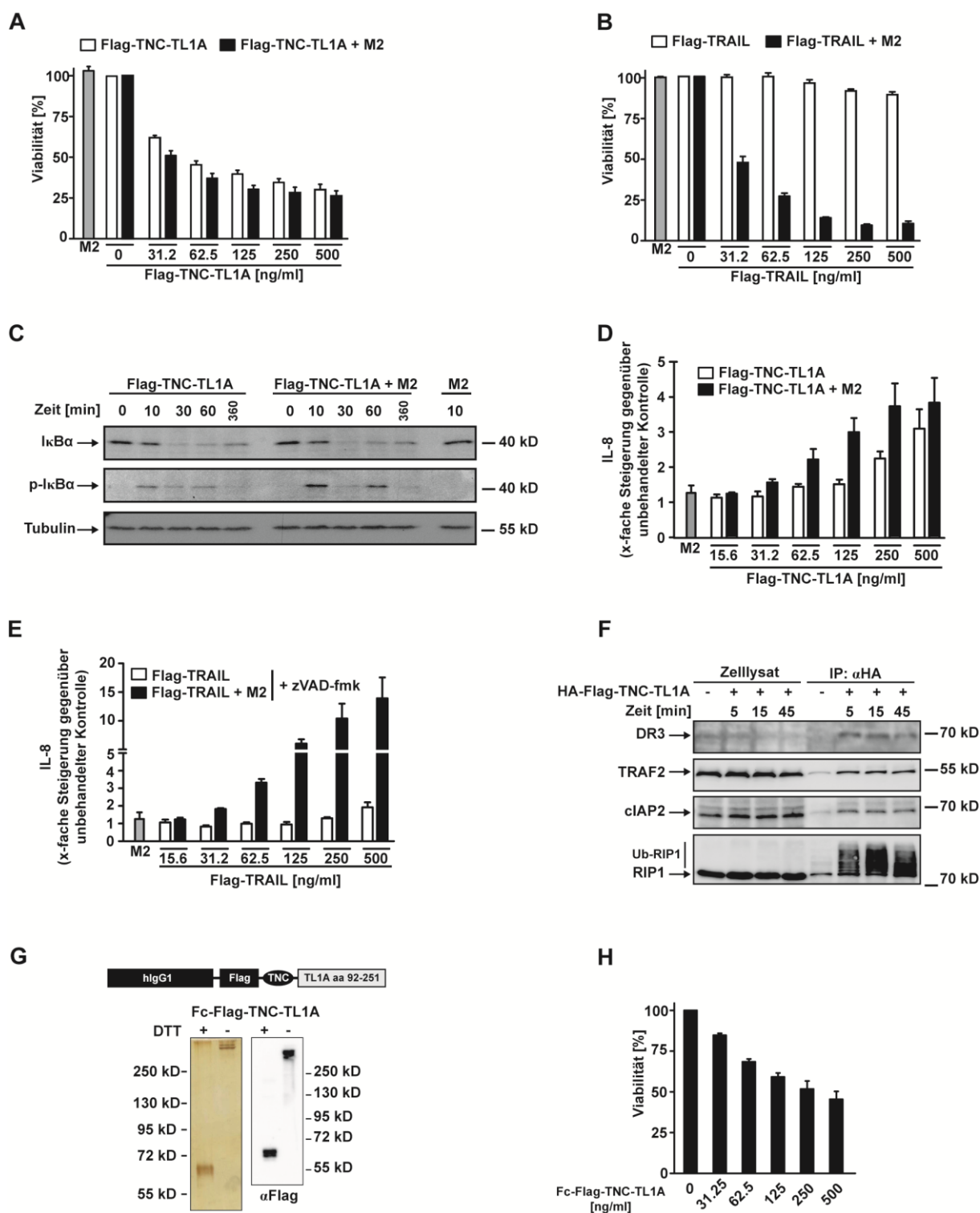
Stimulation von Zellen mit trimerem und quervernetztem Flag-TNC-TL1A resultierte in biphasischer I $\kappa$ B $\alpha$  Phosphorylierung (Abbildung 5 C). Die Phosphorylierung und der Abbau dieses Proteins sind Surrogatmarker für ablaufende Aktivierung des NF $\kappa$ B Signalweges. Die Phosphorylierung nach Stimulation mit quervernetztem Liganden war diskret verstärkt, die Abbaukinetik des NF $\kappa$ B Inhibitors zeigte hingegen keine Unterschiede. Passend dazu konnte bei Quantifizierung von Zellkulturüberständen eine minimal erhöhte Menge des NF $\kappa$ B Zielgenes IL-8 nach Stimulation mit quervernetztem Flag-TNC-TL1A gemessen werden (Abbildung 5 D). Der Effekt erscheint im Vergleich mit dem Effekt der Flag-TRAIL Quervernetzung jedoch marginal. Die Zugabe des M2 Antikörper steigerte die Flag-TRAIL induzierte IL-8 Menge im Zellkulturüberstand um das ca. 15-fache (Abbildung 5 E). In diesem Experiment wurden die Zellen zusätzlich mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk versetzt um massive Apoptose-Induktion durch TRAIL zu verhindern. Die Inkubation der TF-1 Zellen mit M2 Antikörper alleine induzierte keine gesteigerte IL-8 Sekretion (Abbildung 5 D und E).

In Übereinstimmung mit diesen Daten induzierte trimeres HA-Flag-TNC-TL1A die Assoziation von DR3 mit verschiedenen Adaptermolekülen, was den Aufbau des Rezeptorsignalkomplexes belegt. Nach Stimulation von TF-1 Zellen mit dem trimeren Liganden wurden diese gewaschen und lysiert. Anschließend erfolgte die Präzipitation von Ligand plus gebundenem DR3-Rezeptor über anti-HA Agarose Beads (Abbildung 5 F). Die Westernblot-Analyse dieser Immunpräzipitation demonstrierte die Flag-TNC-TL1A-abhängige Rekrutierung der Adaptermoleküle TRAF2, cIAP2 und RIP1 an DR3. Der anti-RIP1 Westernblot zeigte außerdem langsamer wandernde Banden oberhalb des RIP1 Signals. Dabei handelt es sich um ubiquitinyliertes RIP1, was die Formation eines funktionsfähigen Signalkomplexes als Folge der Flag-TNC-TL1A Interaktion erkennen lässt.

Neben der anti-Flag-vermittelten Oligomerisierung besteht auch die Möglichkeit hoch aktive, hexamere TNF Liganden zu generieren [8]. Dazu wurde das Flag-TNC-TL1A Konstrukt am N-terminalen Ende mit einer Fc-Domäne aus humanem IgG1 versehen (Abbildung 5 G, oben). Über die Bildung von Disulfidbrücken zwischen Fc-Domänen lagern sich zwei trimere Moleküle zu einem Hexamer zusammen. Fc-Flag-TNC-TL1A wurde ebenfalls in HEK 293T Zellen exprimiert und über anti-Flag Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Analyse dieses aufgereinigten Liganden mittels SDS-PAGE und Westernblot zeigte unter nicht-reduzierenden Bedingungen die Formation hochmolekularer Komplexe, die mit dem Molekulargewicht eines Hexameres vereinbar sind. Die Stimulation der TF-1 Zellen mit hexamerem Fc-Flag-TNC-TL1A löste ebenfalls nur moderaten Zelltod aus (Abbildung 5 H). Der Dosis-Wirkungseffekt war mit dem von trimerem Flag-TNC-TL1A vergleichbar und deutete keineswegs eine effizientere Aktivierung des Rezeptors an.

Des Weiteren resultierte die Stimulation von DR3 mit trimerem, hexamerem und höher oligomerisiertem TL1A in vergleichbarer Phosphorylierung bzw. Aktivierung der MAP Kinasen p38 und ERK1/2 (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse belegen übereinstimmend, dass zur Rezeptoraktivierung lösliches bzw. trimeres TL1A ausreichend ist. Eine Oligomerisierung von TL1A hat demnach keinen Einfluss auf die Aktivierung pro- und anti-apoptotischer Signalwege.



**Abbildung 5.** Oligomerisierung von löslichem TL1A hat keinen Effekt auf DR3-Signaltransduktion.

A) und B) TF-1 Zellen wurden für 2 h mit CHX (2.5 µg/ml) behandelt und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A (A) oder Flag-TRAIL (B) in Ab- und Anwesenheit des anti-Flag Antikörpers M2 (1 mg/ml) für 18 h stimuliert. Die Auswertung der Experimente erfolgte über MTT-basierte Viabilitätsmessung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. C) TF-1 Zellen wurden in Ab- und Anwesenheit des anti-Flag Antikörpers M2 (1 µg/ml) für die angegebenen Zeitspannen mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, lysiert und mittels spezifischer Antikörper im Westernblot analysiert. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle. D) und E) TF-1 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A (D) oder Flag-TRAIL (E) in Ab- und Anwesenheit des anti-Flag Antikörpers M2 (1 mg/ml) für 6 h stimuliert. Caspase Aktivierung wurde durch Zugabe von zVAD-fmk (100 µM) 1 h vor der Flag-TRAIL Stimulation blockiert. Zellkulturüberstände wurden geerntet und mittels ELISA die sekretierte IL-8 Menge quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. F) TF-1 Zellen wurden mit HA-Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) für die angegebenen Zeitspannen stimuliert. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und dann HA-Flag-TNC-TL1A samt induziertem Rezeptorsignalkomplex über anti-HA Antikörper, gekoppelt auf Agarose Beads, präzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden zusammen mit den korrespondierenden Zelllysaten mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. G) Oben: Schema des exprimierten und aufgereinigten Fc-Flag-TNC-TL1A Konstrukts. Fc-Flag-TNC-TL1A wurde in HEK 293T Zellen exprimiert, über anti-Flag Affinitätschromatographie aufgereinigt, über SDS-PAGE unter reduzierenden (25 mM DTT) und nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Silberfärbung (links) und anti-Flag Westernblot (rechts) analysiert. H) TF-1 Zellen wurden für 2 h mit CHX (2.5 µg/ml) behandelt und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen an Fc-Flag-TNC-TL1A über 18 h stimuliert. Die Auswertung des Experiments erfolgte über MTT-basierte Viabilitätsmessung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten.



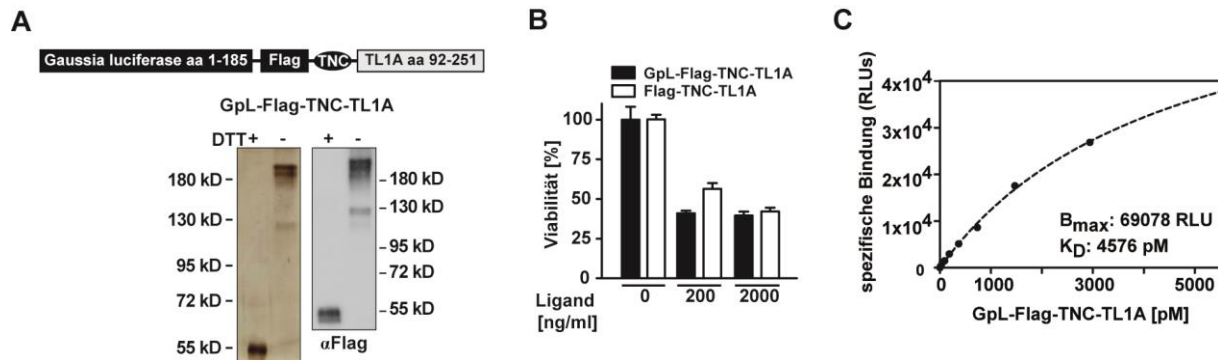
### 4.1.3 Geringe Bindungsaffinität von TL1A zu DR3

Trimeres TL1A reicht zur vollständigen DR3 Rezeptoraktivierung aus. Folglich ist fehlende Oligomeresierung des Liganden als Grund für den, verglichen mit TNF, gemäßigten zytotoxischen Effekt und die moderate NF $\kappa$ B Aktivierung unwahrscheinlich.

Die Affinität eines Liganden zu seinem korrespondierenden Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Rezeptoraktivierung. Die biophysikalische Interaktion von TL1A und DR3 war bislang jedoch kaum untersucht. Die Erstellung von Fusionsproteinen, bestehend aus Ligand und einer Luciferase aus *Gaussia princeps* (GpL), hat sich bei der experimentellen Untersuchung der Rezeptoraffinität auf intakten Zellen als probates Hilfsmittel erwiesen [169]. Deshalb wurde ein Fusionsprotein aus Flag-TNC-TL1A und der Luciferase (Expressionsplasmid ebenfalls von Prof. Dr. Harald Wajant bereitgestellt) abermals in HEK 293T Zellen exprimiert und über anti-Flag Affinitätschromatographie aufgereinigt. Ähnlich wie bei Flag-TNC-TL1A, wanderte der Großteil des GpL-Flag-TNC-TL1A Fusionskonstrukts unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE auf einer Höhe, die mit dem Molekulargewicht eines Trimers vereinbar ist (Abbildung 6 A). Das Molekulargewicht des produzierten Liganden wurde mittels Gelfiltration verifiziert (Daten nicht gezeigt). Wie auch bei anderen TNF Liganden beobachtet wurde [169], hatte die Fusion der GpL Domäne an TL1A keinen nachteiligen Einfluss auf biologische Effekte des Liganden. Flag-TNC-TL1A und GpL-Flag-TNC-TL1A wiesen vergleichbare Aktivität bei der Zelltod-Induktion in CHX behandelten TF-1 Zellen auf (Abbildung 6 B).

Für die Bindungsstudie zur Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurde das produzierte GpL-Flag-TNC-TL1A Fusionsprotein ins Labor von Prof. Dr. Harald Wajant nach Würzburg geschickt, wo die Bindungsstudie durchgeführt wurde, da in diesem Labor die Technik bestens etabliert ist [169]. Dort wurden Bindungsstudien mit GpL-TNC-TL1A an HeLa-Zellen mit Doxycyclin-induzierbarer DR3-Expression durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (14.7 bis 7350 pM) an GpL-Flag-TNC-TL1A für 1 h inkubiert, zehnfach gewaschen und anschließend die Zell-assoziierte Lichtemission (RLU, *relative light units*) nach Substratzugabe gemessen. Zur Berechnung des spezifischen Signals bzw. der spezifischen Bindung wurden unspezifische Signale, abgegeben von Zellen ohne Zugabe von Doxycyclin und damit ohne DR3-Expression, von den totalen RLU-Messwerten abgezogen. Die Berechnung der  $K_D$  aus drei unabhängigen Experimenten ergab eine  $K_D$  von  $3777 \pm 2745$  (Abbildung 6 C). Dieser Wert erscheint ziemlich hoch und beschreibt damit eine relativ geringe Affinität von TL1A zu DR3, verglichen mit vielen anderen Ligand-Rezeptoren Systemen der TNF Familie [169]. Für TNF/TNFR1 beispielsweise findet man in der Literatur  $K_D$  Werte von 19-47 pM [170, 171]. Damit ist die  $K_D$  der TL1A-DR3 Interaktion ca. hundertfach höher als die  $K_D$  der TNF-TNFR1 Interaktion. Diese Diskrepanz könnte zu den beobachteten Unterschieden in LD<sub>50</sub> und NF $\kappa$ B Aktivierung (Abbildung 3 C und D) beitragen.

Die unter 4.1 beschriebenen Untersuchungen zur TL1A-vermittelten DR3 Aktivierung wurden in der Fachzeitschrift *FEBS Journal* publiziert [172].



**Abbildung 6.** TL1A Bindungsstudie

A) Oben: Schema des exprimierten und aufgereinigten GpL-Flag-TNC-TL1A Konstrukts. GpL-Flag-TNC-TL1A wurde in HEK 293T Zellen exprimiert, über anti-Flag Affinitätschromatographie aufgereinigt, über SDS-PAGE unter reduzierenden (25 mM DTT) und nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Silberfärbung (links) und anti-Flag Westernblot (rechts) analysiert. B) TF-1 Zellen wurden für 2 h mit CHX (2.5  $\mu$ g/ml) behandelt und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen an GpL-Flag-TNC-TL1A und Flag-TNC-TL1A stimuliert. Die Auswertung des Experiments erfolgte über MTT-basierte Viabilitätsmessung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. C) HeLa-Zellen mit Doxycyclin-induzierbarer DR3-Expression wurden in einer 24-Well-Platte in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin (100 ng/ml) für 18 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an GpL-Flag-TNC-TL1A bei 37 °C für 1h inkubiert. Um ungebundene Liganden abzuwaschen, wurden die Zellen danach zehnfach mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden geerntet und zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität in 50  $\mu$ l Medium in einer Black-Well Platte aufgenommen. Die GpL Aktivität bzw. die Lumineszenz wurde unter Verwendung eines Gaussia luciferase Assay Kit (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) in einem Luminometer (AnthosLabtec Instruments, Krefeld, Deutschland) gemessen. Unspezifische Bindung wurde durch Zellen ohne Doxycyclin-Zugabe bestimmt. Die absolute Bindung wurde mit Doxycyclin-behandelten Zellen bestimmt und zur Berechnung der spezifischen Bindung der Messwert der unspezifischen Bindung abgezogen. Die spezifische maximale Bindung ( $B_{MAX}$ ) von GpL-Flag-TNC-TL1A und die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurde mit nicht-linearer Regressionsanalyse unter Verwendung des GRAPHPAD PRISM5 Software-Programms berechnet.

## 4.2 DR3 initiiert apoptotischen und nekroptotischen Zelltod

### 4.2.1 IAP Depletion verstärkt DR3-induzierte Zytotoxizität

DR3 aktiviert nach Ligandenbindung in erster Linie anti-apoptotische Signalwege wie NFκB und MAP Kinasen (siehe 2.3 und 4.1.1 Abbildung 3). Erst die Inhibition der anti-apoptotischen Signalwege führt zum Umschalten des Rezeptorsignals in Richtung Apoptose [121, 126]. Durch Inhibition der Translation mit Cycloheximid wird beispielsweise die NFκB-vermittelte Hochregulation anti-apoptotischer Proteine unterbunden, was die Apoptose-Induktion ermöglicht. Allerdings leitet TNFR1 Stimulation auch bei unvollständiger Zusammensetzung des primären Signalkomplexes unmittelbar zytotoxische Effekte ein. Fehlen zum Zusammenbau des Komplexes beispielsweise wichtige Komponenten wie cIAP1/2 oder TAK1, induziert TNFR1 die Formation des pro-apoptotischen/ pro-nekroptotischen zytoplasmatischen Komplexes IIa bzw. IIb (siehe 2.1.3).

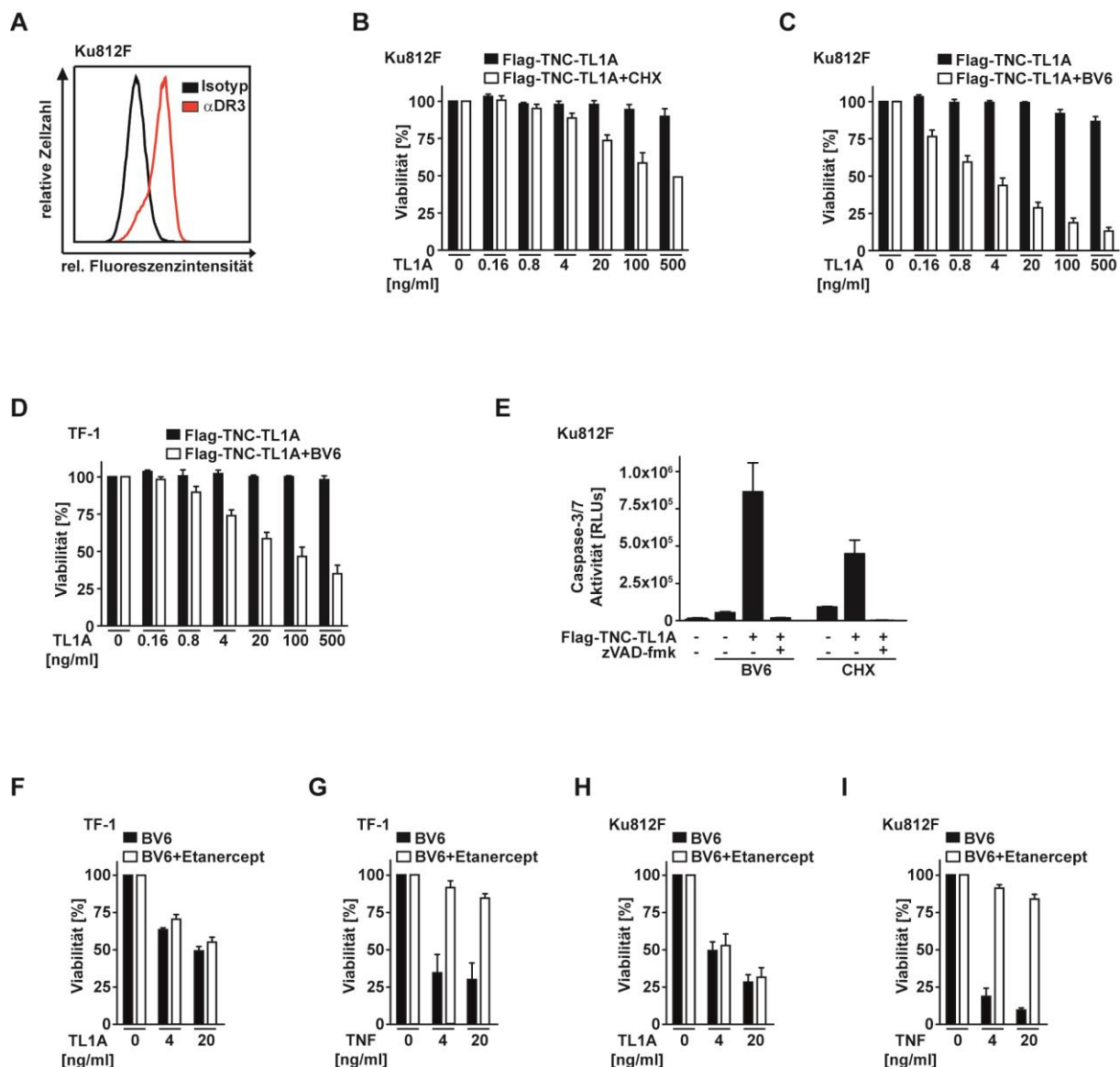
Um diesen Mechanismus eventuell in der Tumorthherapie nutzen zu können, wurden niedermolekulare Moleküle entwickelt, welche die Eigenschaft des pro-apoptotischen Proteins SMAC (*Second mitochondria-derived activator of caspase*) nachahmen. Diese SMAC Mimetika (SM) induzieren die Dimerisierung von IAPs (*Inhibitor of apoptosis proteins*), wie cIAP1/2 und XIAP. Als Folge der Dimerisierung werden diese E3-Ubiquitin-Ligasen aktiviert und markieren sich über Ubiquitylierung zum proteasomalen Abbau. Infolgedessen fehlen cIAP1/2 als essentielle Faktoren zum Aufbau des primären Rezeptorsignalkomplexes. RIP1 kann nicht mehr ubiquityliert werden, woraufhin auch keine weiteren Komponenten wie TAB2/3-TAK1 rekrutiert werden und der „frühe Checkpoint“ außer Kraft gesetzt wird (siehe 2.1.3). Auf diese Weise wird das TNFR1 Signal in Richtung Zelltod umgelenkt [173, 174]. Ob eine Sensibilisierung von Zellen gegenüber DR3-induziertem Zelltod mittels SM möglich ist, wurde bislang nicht untersucht.

Humane Ku812F Zellen stammen ursprünglich aus einer chronischen myeloischen Leukämie und weisen endogene DR3-Oberflächenexpression auf (Abbildung 7 A). Die Stimulation dieser Zellen führt selbst mit hohen Dosen Flag-TNC-TL1A nur zu geringfügiger Zelltod-Induktion (Abbildung 7 B). Ku812F Zellen wurden jedoch durch die Zugabe von CHX, ähnlich wie TF-1 Zellen, gegenüber DR3-induziertem Zelltod sensitiviert (Abbildung 7 B). Allerdings blieb die Zelltodrate auch in Ku812F Zellen selbst unter Verwendung hoher Dosen Flag-TNC-TL1A in Kombination mit CHX moderat. Die Vorbehandlung der Zellen mit dem SM BV6 führte indessen zu einer robusten Zelltod-Induktion in Abhängigkeit der Flag-TNC-TL1A Konzentration (Abbildung 7 C). Bereits 4 ng/ml des Liganden reichten aus, um über 50 Prozent der Ku812F Zellen abzutöten. Ebenso wurden TF-1 Erythroleukämie-Zellen durch die Vorbehandlung mit BV6 erfolgreich gegenüber Flag-TNC-TL1A-induziertem Zelltod sensitiviert (Abbildung 7 D). Die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 nach CHX/Flag-TNC-TL1A und BV6/Flag-TNC-TL1A stand gewissermaßen in Einklang mit den beobachteten Unterschieden bzgl. der Zelltodraten (Abbildung 7 E). Die Aktivierung der Caspasen belegt ferner apoptotischen Zelltod. Durch Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk konnte die Aktivierung der Caspasen vollständig blockiert werden.

SMAC Mimetika können auch über alternative NFκB Aktivierung Zellen zur TNF Sekretion anregen [173]. Daher wurde überprüft, ob dies auch in Ku812F oder TF-1 Zellen der Fall ist und die gesteigerte Zelltodrate durch autokrine TNF Sekretion zustande kommt.

Dazu wurden TF-1 und Ku812F Zellen in An- und Abwesenheit des Fusionsproteins Etanercept (zur TNF-Neutralisation) mit BV6 inkubiert und anschließend mit TNF oder Flag-TNC-TL1A stimuliert. Während TNF-vermittelter Zelltod durch Etanercept effektiv blockiert wurden (Abbildung 7 G und I), blieb die Flag-TNC-TL1A-initiierte Zelltod-Induktion unbeeinflusst (Abbildung 7 F und H). Die Apoptose-Induktion in den Tumorzelllinien nach BV6 Behandlung ist dementsprechend nicht von autokriner TNF-Sekretion abhängig, sondern wird direkt über TL1A/DR3 vermittelt.

Zusammenfassend zeigen die Daten aus Abbildung 7, dass eine Sensitivierung von (entarteten) Zellen gegenüber DR3-induziertem Zelltod mittels SM möglich ist. Da sich unterschiedliche SM bereits in klinischen Studien befinden und als durchaus vielversprechend eingestuft werden [175], könnte die Kombination von SMAC Mimetika mit TL1A für eine Anwendung in der Tumorthherapie in Zukunft äußerst interessant werden.



**Abbildung 7.** IAP-Depletion verstärkt DR3-induzierten Zelltod.

A) Die Oberflächenexpression von DR3 auf Ku812F Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. B-D) Ku812F und TF-1 Zellen wurden für 2 h mit CHX (2.5 µg/ml) oder BV6 (Ku812F: 3µM; TF-1: 10µM) behandelt und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A für 18 h stimuliert. Die Auswertung der Experimente erfolgte über MTT-basierte Viabilitätsmessung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei durchgeführten Experimenten. E) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3 µM, 2 h) oder CHX (2.5 µg/ml, 2 h) und/oder zVAD-fmk (100 µM, 1 h) inkubiert und anschließend mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) stimuliert. 150 min nach Flag-TNC-TL1A Zugabe wurde die Caspase 3/7 Aktivität unter Verwendung des Cell Meter™ Caspase 3 / 7 Activity Apoptosis Assay Kit (AAT Bioquest, Sunnyvale, USA) gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei durchgeführten Experimenten. F-I) Ku812F Zellen wurden für 2 h mit BV6 (TF-1 10 µM, Ku812F 3 µM) behandelt und dann mit TNF oder Flag-TNC-TL1A in Ab- und Anwesenheit von Etanercept (1 mg/ml) stimuliert. Die Auswertung der Experimente erfolgte über MTT-basierte Viabilitätsmessung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei durchgeführten Experimenten. RLU: *relative light units*

#### 4.2.2 Caspase-unabhängige Zytotoxizität von DR3

Interessanterweise war die Aktivierung von Caspasen nach IAP Depletion nicht ausschlaggebend für DR3-induzierten Zelltod.

In cIAP1/2-depletierten Ku812F Zellen blockierte der Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M effizient die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 (Abbildung 7 E). Ebenso wurde in Westernblot-Analysen keine Prozessierung bzw. Aktivierung der Effektorcaspase-3 sowie der Initiatorcaspase-8 nach BV6/Flag-TNC-TL1A und zVAD-fmk Behandlung mehr festgestellt (Abbildung 8 A). Die Behandlung der Zellen mit BV6 und Flag-TNC-TL1A hingegen hatte vollständige Prozessierung der beiden Caspasen zur Folge.

Allerdings hatte die Inhibition der Caspasen keinen Effekt auf DR3-induzierten Zelltod. Das Absterben der cIAP1/2-depletierter Zellen nach Flag-TNC-TL1A Stimulation war in An- und Abwesenheit von zVAD-fmk nahezu identisch (Abbildung 8 B). Diese Daten demonstrieren eindeutig, dass DR3 in der Lage ist Caspase-unabhängigen Zelltod zu initiieren.

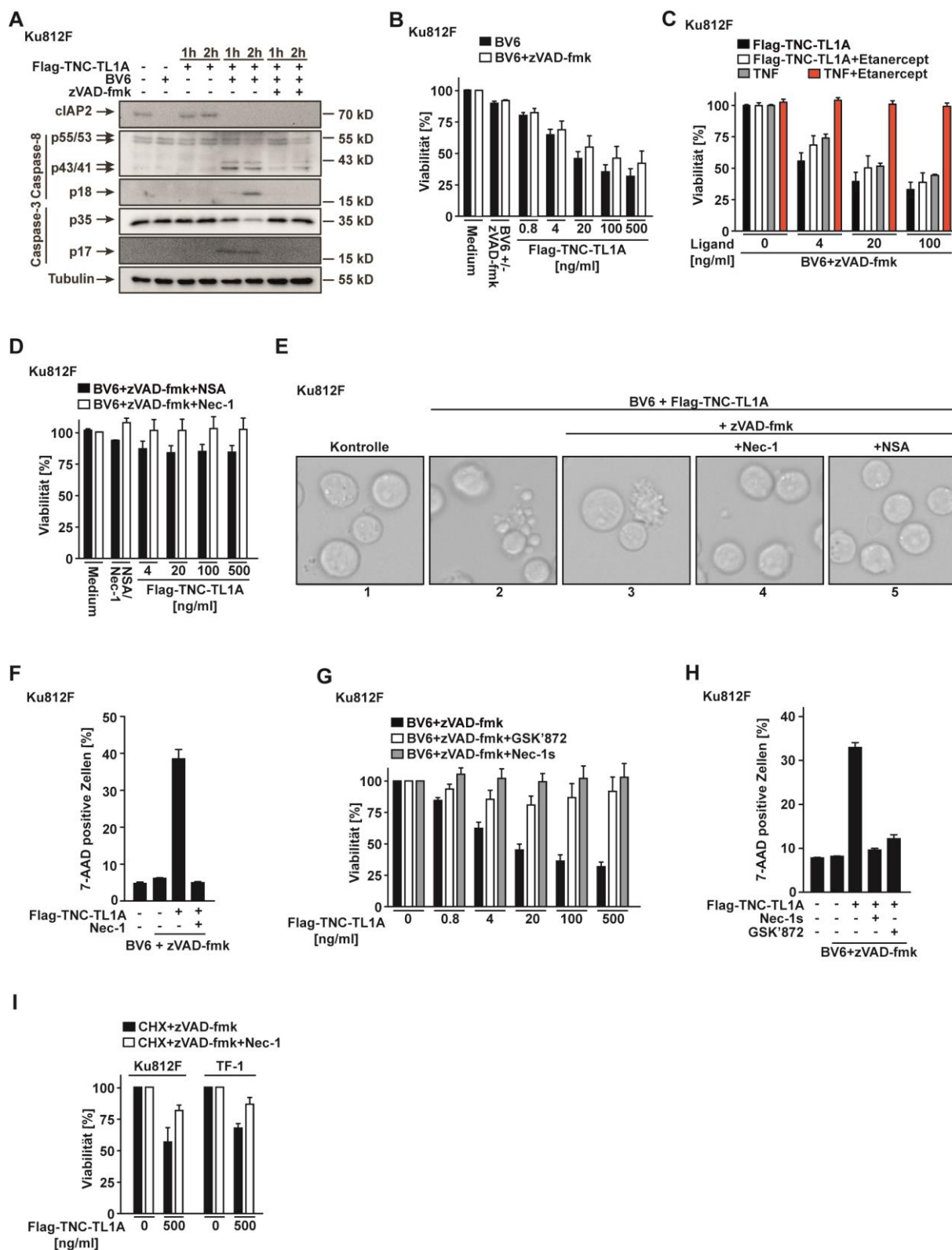
Da auch zVAD-fmk für einige Zelllinien in der Literatur als TNF-induzierend beschrieben wurde [176], musste erneut eine Beteiligung von sekretiertem TNF ausgeschlossen werden. Während BV6/zVAD-fmk-behandelte Zellen durch Anwesenheit von Etanercept vor Zelltod, vermittelt durch exogene Zugabe von TNF, geschützt waren, war kein Einfluss von Etanercept auf Flag-TNC-TL1A-vermittelten Zelltod erkennbar (Abbildung 8 C). Demnach ist auch die Flag-TNC-TL1A-induzierte Zytotoxizität bei BV6/zVAD-fmk-behandelten Ku812F Zellen unabhängig von autokriner TNF-Sekretion.

Abgesehen von Caspase-abhängiger Apoptose können einige TNF-Rezeptoren auch Caspase-unabhängige Nekroptose auslösen (siehe 2.1.5). Diese Form des geordneten Zelltodes ist abhängig von RIP1, RIP3 und MLKL [87, 88, 97]. Ob DR3 in der Lage ist nekroptotischen Zelltod auszulösen, wurde bislang noch nicht untersucht.

Tatsächlich konnte sowohl die Inhibition der RIP1 Kinase über Nec-1 als auch die Inhibition der Pseudokinase MLKL über NSA Flag-TNC-TL1A-induzierten Zelltod in BV6/zVAD-fmk behandelten Zellen vollständig blockieren (Abbildung 8 D). Diese Erkenntnis lässt bereits Nekroptose als ablaufendes Zelltodprogramm vermuten.

Weitere Argumente lieferte die morphologische Veränderung der sterbenden Zellen. BV6-behandelte Zellen zeigten nach Flag-TNC-TL1A Stimulation typisch apoptotische Merkmale wie die Verkleinerung des Zellvolumens sowie das Abschnüren von kleinen membranumhüllten Vesikeln (Abbildung 8 E, Bild 2).

Durch zusätzliche Vorbehandlung mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk veränderte sich die Morphologie der Zellen grundlegend. Nachdem sich unter diesen Bedingungen das Zellvolumen nach Flag-TNC-TL1A Stimulation vergrößert hatte, wurde ein regelrechtes Aufplatzen der Zellen beobachtet (Abbildung 8 E, Bild 3). Übereinstimmend mit den protektiven Effekten im Zytotoxizitätsassay schützten Nec-1 und NSA mit BV6/zVAD-fmk/TL1A-behandelte Zellen ebenso vor morphologischen Veränderungen (Abbildung 8 E, Bild 4 und 5).



**Abbildung 8.** DR3-induziert Caspase-unabhängigen Zelltod.

A) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h)  $\pm$  zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) inkubiert und im Anschluss mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) für 1 h oder 2 h stimuliert. Danach wurden die Zellen gewaschen und Zelllysate hergestellt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot unter Verwendung spezifischer Antikörper. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle. B) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h)  $\pm$  zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) vorbehandelt und dann mit den angegebenen Konzentration an Flag-TNC-TL1A für 4 h stimuliert. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Färbung (weitere 2 h) gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. C) Ku812F Zellen wurden mit BV6 und zVAD-fmk wie unter B) behandelt und anschließend in An- und Abwesenheit von Etanercept (1mg/ml) in den angegebenen Konzentrationen mit TNF oder Flag-TNC-TL1A für 4 h stimuliert. Die Viabilität wurde mittels MTT-Färbung (weitere 2 h) gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. D) Ku812F Zellen wurden wie unter B) mit BV6 und zVAD-fmk behandelt. Zusätzlich wurde 1 h vor Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A Nec-1 (100  $\mu$ M) oder NSA (25  $\mu$ M) zugesetzt. Die Zellviabilität wurde 4 h nach Stimulation mit Flag-TNC-TL1A mittels MTT-Färbung (weitere 2 h) gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. E) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) in Ab- und Anwesenheit von Nec-1 (100  $\mu$ M) oder NSA (25  $\mu$ M) inkubiert und anschließend mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) stimuliert. Die Zellmorphologie wurde 3 h nach Stimulation mittels Hellfeld-Mikroskopie analysiert. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente. F) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h)  $\pm$  Nec-1 (100  $\mu$ M) inkubiert und anschließend mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) für 4 h stimuliert. Danach wurden die Zellen mit 7-AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. G) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) behandelt und in Ab- und Anwesenheit von Nec-1s (30  $\mu$ M) oder GSK'872 (8  $\mu$ M) mit den angegebenen Konzentrationen Flag-TNC-TL1A für 4 h stimuliert. Die Zellviabilität wurde über MTT-Färbung (weitere 2 h) bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. G) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) behandelt und in Ab- und Anwesenheit von Nec-1s (30  $\mu$ M) oder GSK'872 (8  $\mu$ M) mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) für 4 h stimuliert. Danach wurden die Zellen mit 7-AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. I) Ku812F und TF-1 Zellen wurden mit CHX (2.5  $\mu$ g/ml) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M) in Ab- und Anwesenheit von Nec-1 (100  $\mu$ M) für 2 h inkubiert. Dann wurden die Zellen mit Flag-TNC-TL1A (500 ng/ml) für 18 h stimuliert. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Färbung (weitere 2 h) gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten.



7-Aminoactinomycin (7-AAD), ein orange-rotes Peptid, kann nach Zusammenbruch der Membranintegrität in die DNA toter Zellen interkalieren und eignet sich somit als Surrogatmarker für tote Zellen. In Übereinstimmung mit den Daten aus den Viabilitätsmessungen führte die Behandlung von Ku812F Zellen mit BV6/zVAD-fmk/TL1A zu einem Anstieg der 7-AAD positiven Zellen (Abbildung 8 F). Die Abhängigkeit dieses Absterbens von der RIP1 Kinaseaktivität konnte durch Zugabe von Nec-1 nochmals bewiesen werden.

Ferner konnten BV6/zVAD-fmk-behandelte Zellen auch durch Verwendung von 7-Cl-O-Nec1 (auch bekannt als Nec-1s), einer neueren und spezifischeren Variante des RIP1 Inhibitors, gegenüber Flag-TNC-TL1A-initiiertem Zelltod vollends protektiert werden. Dies konnte sowohl im MTT-basierten Zytotoxizitätsassay als auch mittels 7-ADD Färbung und Durchflusszytometrie bestätigt werden (Abbildung 8 G und H).

Des Weiteren wurde auch die Abhängigkeit des Zellsterbens von der Kinase RIP3 belegt. RIP3 ist als Komponente des Nekrosoms essentiell für die Aktivierung des Effektormoleküls MLKL und damit eine zentrale Komponente des nekroptotischen Zelltodprogramms. Die pharmakologische Inhibition dieser Kinase mit GSK‘872 blockierte DR3-vermittelten Verlust der Zellviabilität (Abbildung 8 G) sowie der Membranintegrität (Abbildung 8 H) in BV6/zVAD-fmk behandelten Ku812F Zellen.

Ist die Caspase-Aktivierung in Zellen blockiert, kann neben SMAC Mimetika auch CHX diese Zellen gegenüber Todesrezeptor-induzierter Nekroptose sensitiveren [112]. Die Behandlung von Ku812F und TF-1 Zellen mit CHX/zVAD-fmk/TL1A leitete ebenfalls, wenn auch auf niedrigem Niveau, Zelltod ein. Die Inhibition der RIP1 Kinase mittels Nec-1 protektierte Zellen unter diesen Bedingungen gegenüber Flag-TNC-TL1A-induziertem Zelltod (Abbildung 8 I).

DR3 ist demnach in der Lage in Abwesenheit von cIAP1/2 (und bei Blockade der Proteintranslation), Caspase-unabhängig Zelltod auszulösen. DR3-vermittelter Zelltod ist unter diesen Bedingung abhängig von MLKL und von der Aktivität der Kinasen RIP1 und RIP3. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Aktivierung von DR3 nekroptotischen Zelltod einleiten kann.

#### 4.2.3 TL1A induziert die Formation des Nekrosoms

Die Formation des sogenannten Nekrosoms ist charakteristisch für nekroptotischen Zelltod. Das Nekrosom ist für die Aktivierung des Effektors MLKL essentiell und besteht aus den Komponenten RIP1 und RIP3, welche nach Interaktion eine amyloide Struktur ausbilden [90]. Die nekroptotischen Kernkomponenten RIP3 und MLKL wurden in TF-1 und KU812F Zellen exprimiert, wenngleich die zellulären RIP3 Level in TF-1 Zellen deutlich niedriger waren (Abbildung 9 A). In Immunpräzipitationsexperimenten (IP) wurde festgestellt, dass in Anwesenheit von BV6 und zVAD-fmk die Stimulation von Ku812F Zellen mit Flag-TNC-TL1A die Interaktion von RIP1 mit RIP3 herbeiführt (Abbildung 9 B). Durch Inhibition der auto-/trans-Phosphorylierung des RIP1/RIP3 Komplexes, vermittelt durch Inhibition der RIP1 Kinase über Nec-1, konnte die Komplexbildung verhindert werden.

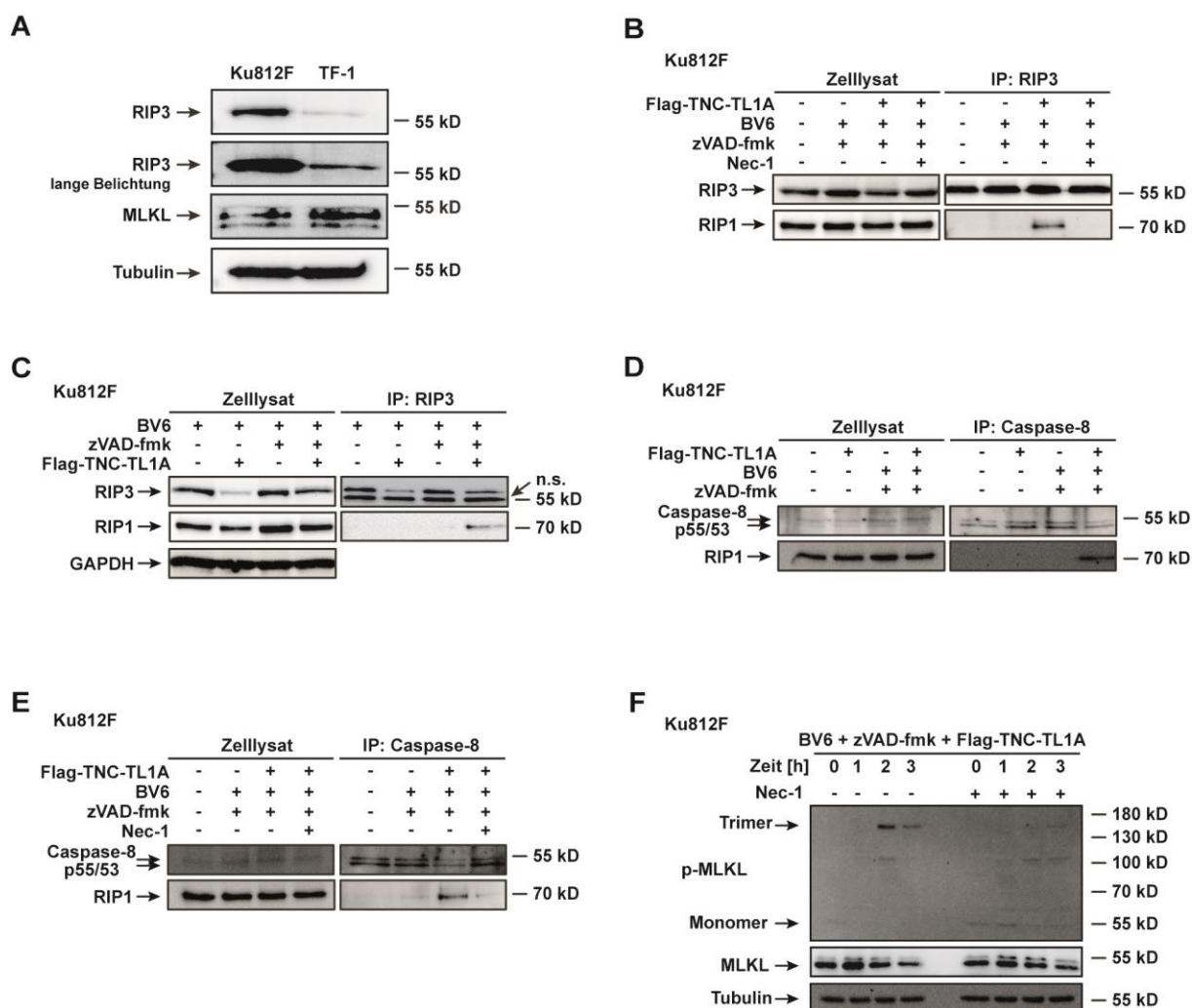
Die RIP1/RIP3 Komplexbildung war spezifisch für DR3-vermittelte Nekroptose, da diese unter apoptotischen Bedingungen nicht mehr stattfinden konnte. In Abwesenheit von zVAD-fmk wurden geringere RIP3 Level im Zelllysats und keine Interaktion von RIP1 und RIP3 in der IP mehr detektiert (Abbildung 9 C). Vermutlich wurde in Abwesenheit von zVAD-fmk RIP3 nach Rezeptoraktivierung von Caspasen gespalten, da RIP3 ein Caspase Substrat darstellt [177]. Dementsprechend blieben die zellulären RIP3 Level und Nekrosombildung in Anwesenheit von zVAD-fmk erhalten (Abbildung 9 C).

Des Weiteren wurde unter nekroptotischen Bedingungen nach Stimulation mit Flag-TNC-TL1A die Interaktion von RIP1 mit Caspase-8 mittels IP nachgewiesen (Abbildung 9 D). Diese Interaktion weist auf die Bildung des zytoplasmatischen Komplex IIb (siehe 2.1.3, Abbildung 2) hin und wurde gleichermaßen für TNF-induzierte Nekroptose beschrieben [88]. Auch die Bildung dieses Komplexes ist von der RIP1 Kinaseaktivität abhängig. Folglich konnte die Interaktion von RIP1 mit Caspase-8 in cIAP1/2-depletierten Zellen durch die Zugabe von Nec-1 unterbunden werden (Abbildung 9 E).

Nach Formation des Nekrosoms kann RIP3 über Phosphorylierung das Effektormolekül MLKL aktivieren [94, 97]. MLKL bildet daraufhin Homotrimere, transloziert an die Zellmembran, perforiert diese und vollzieht damit den finalen Schritt des nekroptotischen Zelltodes [100].

In BV6/zVAD-fmk-behandelten Ku812F Zellen induzierte Flag-TNC-TL1A die Phosphorylierung von MLKL (Abbildung 9 F). Da die Phosphorylierung von MLKL am Ser358 essentiell für die Aktivierung von humanem MLKL ist, wurde zur Detektion ein spezifischer Antikörper verwendet, der genau diese Phosphorylierung erkennt. Interessanterweise wanderte die erkannte Bande in der SDS-PAGE auf einer Höhe, die mit dem Molekulargewicht eines Trimers vereinbar ist. Die Bildung von derart SDS-stabilen phosphorylierten MLKL Aggregaten wurde bereits in Literatur beschrieben [178]. Konform mit RIP3-abhängiger MLKL Aktivierung, wurde kein phosphoryliertes MLKL detektiert, wenn die RIP1/RIP3 Komplexbildung mittels Nec-1 blockiert wurde.

Zusammenfassend demonstrieren die Daten aus Abbildung 9, dass DR3 in BV6/zVAD-fmk behandelten Zellen zum einen die Interaktion von Caspase-8 mit RIP1 initiiert, was auf die Formation des zytoplasmatischen Komplex II hindeutet. Zum anderen werden durch TL1A/DR3 die Formation des Nekrosoms, bestehend aus RIP1 und RIP3, und die Aktivierung von MLKL eingeleitet. DR3 wird anhand dieser Daten erstmalig als Nekroptose-induzierender Rezeptor identifiziert.



**Abbildung 9.** TL1A induziert die Formation des Nekrosoms.

A) Zelluläre RIP3 und MLKL Proteinlevel wurden in Ku812F Zellen und TF-1 Zellen mittel Westernblot analysiert. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle. B)-E) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) vorbehandelt und dann in An- und Abwesenheit von Nec-1 (100  $\mu$ M) mit Flag-TNC-TL1A (400 ng/ml) für 2 h (B und C) oder für 1 h (D und E) stimuliert. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden die Zelllysate mit Antikörpern, spezifisch für Caspase-8 oder RIP3, bei 4 °C über Nacht inkubiert und die gebundenen Immunkomplexe mittels Protein-G Agarose Beads am nächsten Tag aus dem Zelllysate angereichert. Die Analyse der Immunpräzipitationen und der korrespondierenden Zelllysate erfolgte über SDS-PAGE und Westernblot. F) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) vorbehandelt und dann in An- und Abwesenheit von Nec-1 (100  $\mu$ M) mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und unter Verwendung spezifischer Antikörper mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle.

#### 4.2.4 DR3-vermittelte Nekroptose ist abhängig von HSP90 und RIP3

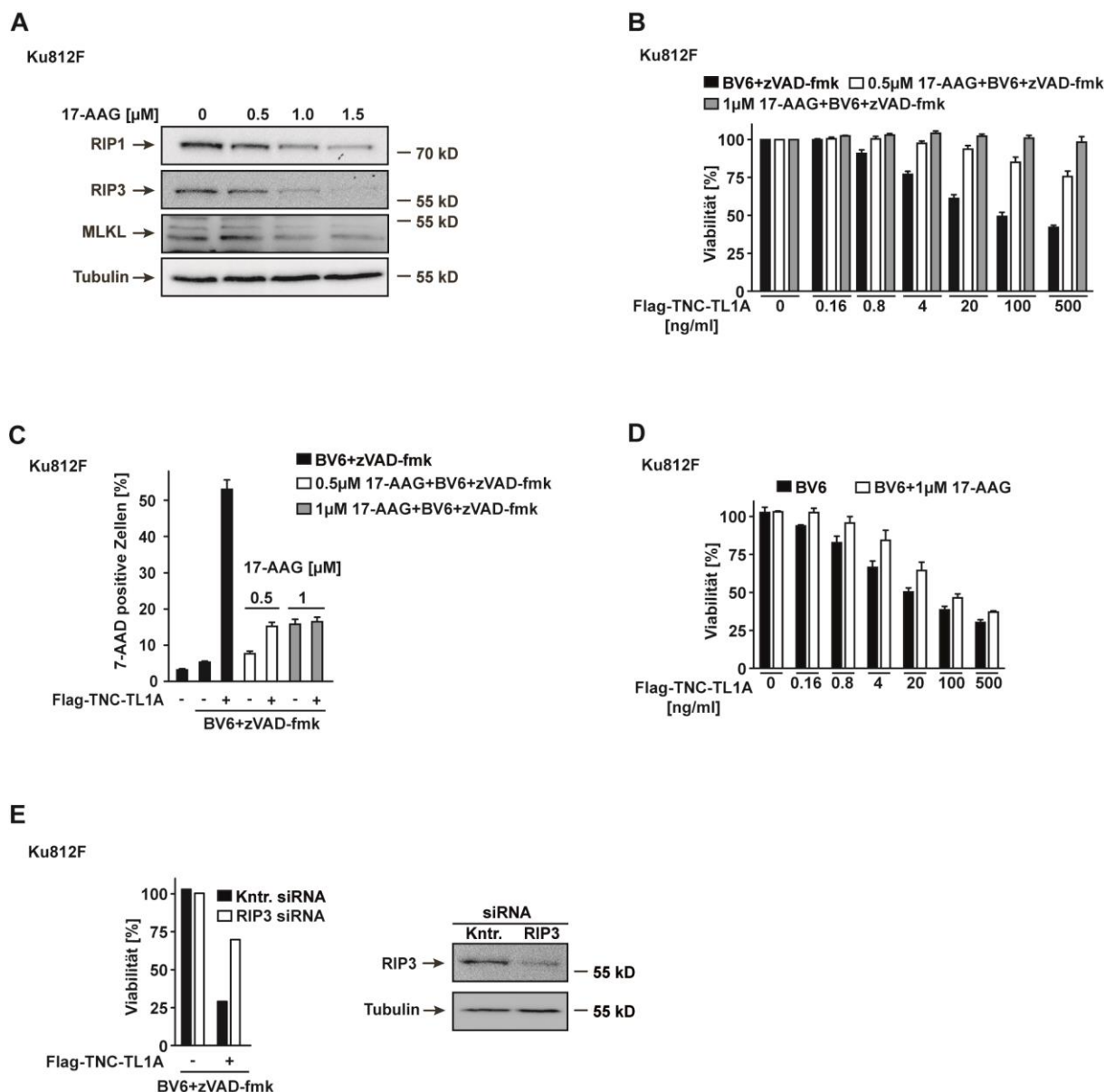
Die richtige Proteinfaltung der Komponenten RIP1, RIP3 und MLKL ist essentiell für deren Funktion und den Ablauf des nekroptotischen Zelltodprogramms. Dafür zuständig ist u.a. das Chaperon HSP90 (*Heat shock protein 90*). Die Inhibition der HSP90 Aktivität hat die Fehlfaltung und proteasomale Degradation dieser Proteine zur Folge [179-182]. In Übereinstimmung mit der Literatur hatte die pharmakologische Inhibition von HSP90 über 24 Stunden mittels 17-AAG (17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin) in Ku812F Zellen eine dosisabhängige Abnahme der RIP1-, RIP3- und MLKL-Proteinlevel zur Konsequenz (Abbildung 10 A).

In Anwesenheit von BV6 und zVAD-fmk wurde in den Zellen mit verminderter RIP1/RIP3/MLKL Proteinmenge erwartungsgemäß durch Flag-TNC-TL1A weniger (0.5  $\mu$ M 17-AAG) bis kein (1  $\mu$ M 17-AAG) zytotoxischer Effekt im Viabilitätsassay mehr beobachtet (Abbildung 10 B). Dementsprechend wurde auch die Membranintegrität in 17-AAG-vorbehandelten Zellen nach Flag-TNC-TL1A Stimulation aufrechterhalten, was sich durch verminderte 7-AAD Positivität widerspielte (Abbildung 10 C).

Erwartungsgemäß konnte die 17-AAG Vorbehandlung Ku812F Zellen nicht vor DR3-induzierter Apoptose, ausgelöst durch Behandlung mit BV6 und Flag-TNC-TL1A, geschützt werden (Abbildung 10 D).

RIP3 hat als Komponente des Nekrosoms und als direkter Aktivator von MLKL eine essentielle Funktion um den Ablauf von Nekroptose zu gewährleisten. Um die Daten der pharmakologischen Inhibition der RIP3-Kinaseaktivität mittels GSK‘872 (Abbildung 8 G und H) zu unterstützen, wurde zusätzlich eine Stilllegung der RIP3 Expression über RNA-Interferenz durchgeführt. siRNA-vermittelte Minderung der zellulären RIP3 Level protektierte BV6/zVAD-fmk-behandelte Ku812F Zellen vor Flag-TNC-TL1A induziertem nekroptotischem Zelltod (Abbildung 10 E). Dieses Experiment beweist nochmals die RIP3 Abhängigkeit der DR3-induzierten Nekroptose.

Die in Abbildung 10 gezeigten Daten demonstrieren die Abhängigkeit von TL1A/DR3-induziertem, Caspase-unabhängigem Zelltod von RIP1, RIP3 und MLKL und bekräftigen damit die Identifikation von DR3 als Auslöser von Nekroptose. Gleichzeitig belegen die Daten, dass für den Ablauf DR3-vermittelter Nekroptose die Funktionalität des Chaperons HSP90 zur Aufrechterhaltung der Proteinstabilität dieser Moleküle eine notwendige Voraussetzung ist.



**Abbildung 10.** DR3-induzierte Nekroptose ist abhängig von HSP90 und RIP3.

A) Ku812F Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des HSP90 Inhibitors 17-AAG für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, lysiert und die RIP1, RIP3 und MLKL Proteinlevel mittels Westernblot unter Verwendung spezifischer Antikörper untersucht. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle. B) Ku812F Zellen wurden für 24 h mit 17-AAG (0.5 und 1.0  $\mu$ M) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) behandelt und schließlich mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A stimuliert. 4 h nach Stimulation erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Färbung (weitere 2 h). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. C) Ku812F Zellen wurden wie unter B) beschrieben behandelt und dann mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) für 4 h stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 7-AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten

Experimenten. D) Ku812F Zellen wurden für 24 h mit 1  $\mu$ M 17-AAG inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen, mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h) behandelt und mit Flag-TNC-TL1A in unterschiedlicher Konzentration stimuliert. 4 h nach Stimulation erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Färbung (weitere 2 h). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. E) Ku812F Zellen wurden mit Kontroll (Knt.) oder RIP3-spezifischer siRNA elektroporiert. 48 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) behandelt und mit Flag-TNC-TL1A (500 ng/ml) für 4 h stimuliert. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Färbung (weitere 2 h) bestimmt. Die Effizienz der siRNA-vermittelten Verminderung der RIP3 Expression wurde 48 h nach Elektroporation über Westernblot untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

#### 4.2.5 TAK1, ein Regulator DR3-induzierter Nekroptose

Einige neuere Studien beschreiben eine protektive Rolle der *TGF- $\beta$ -activated kinase 1* (TAK1) bei TNF-induzierter, RIP1-abhängiger apoptotischer und nekroptotischer Zelltod-Induktion [47, 57]. Bindung von TNF an TNFR1 leitet die cIAP1/2-abhängige Ubiquitinylierung von RIP1 ein (siehe 2.1.3). Die daraufhin folgende Rekrutierung von TAK1 an ubiquitinyliertes RIP1 ermöglicht die Aktivierung des ebenfalls rekrutierten IKK $\alpha$ / $\beta$  Komplexes [48]. IKK $\alpha$ / $\beta$  kann dann über eine inhibierende RIP1 Phosphorylierung die Formation des RIP1 Kinase-abhängigen pro-apoptotischen und/oder pro-nekroptotischen Komplex Iib verhindern („früher Checkpoint“ [43]). Daher ist nicht die Ubiquitinylierung von RIP1 *per se*, sondern die Ubiquitin-abhängige Rekrutierung und Aktivierung von TAK1 sowie IKK $\alpha$ / $\beta$  für die Verhinderung der Zelltod-Induktion verantwortlich. Aufgrund dieser entscheidenden Bedeutung von TAK1 im TNF/TNFR1 Signalweg wurde die Rolle von TAK1 bei DR3-vermitteltem Zelltod untersucht.

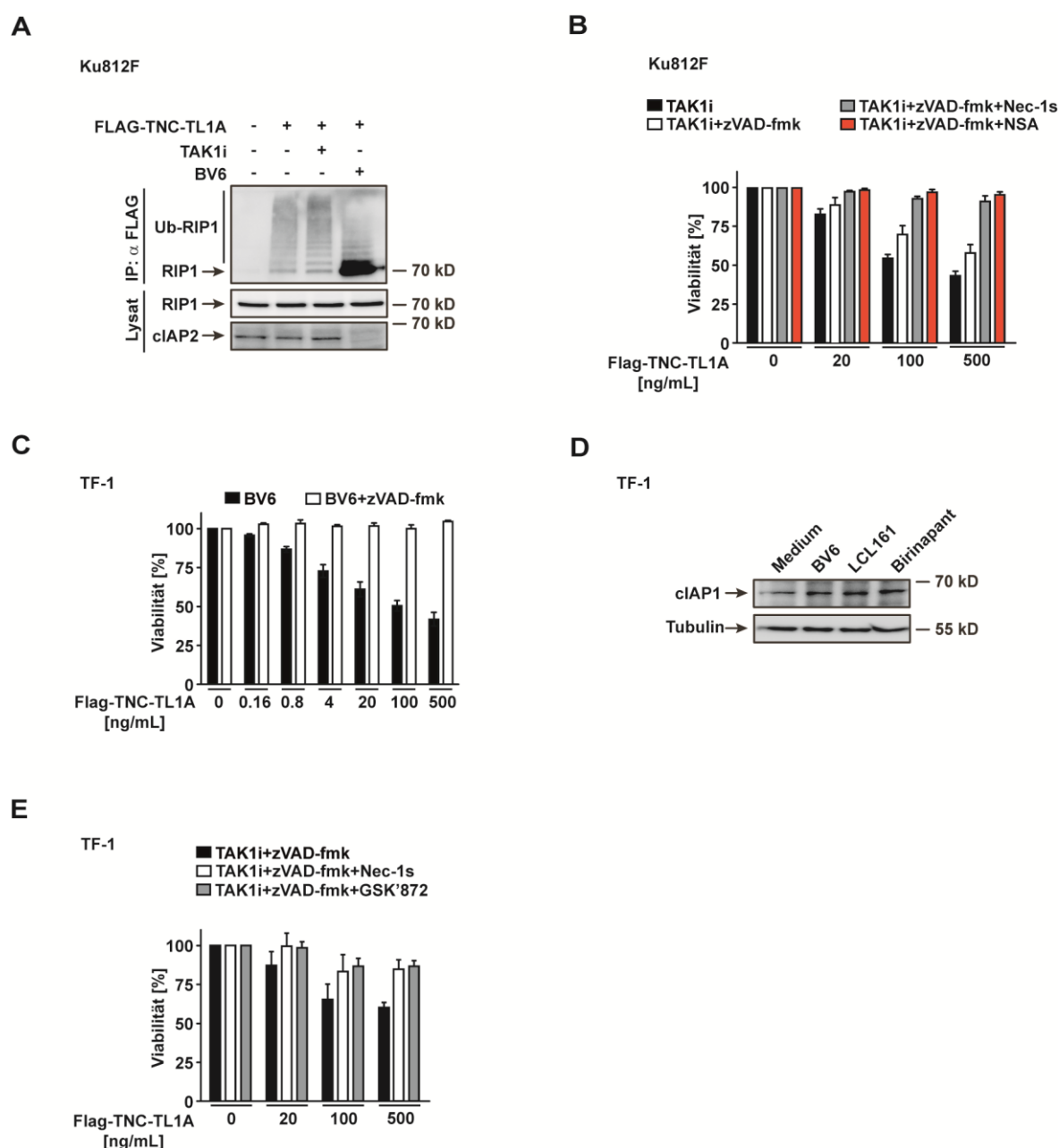
In Immunpräzipitationsexperimenten wurden Ku812F Zellen nach Vorbehandlung mit BV6 oder dem TAK1 Inhibitor (5Z)-7-oxozeaenol (TAK1i) mit Flag-TNC-TL1A stimuliert. Dann wurde über den anti-Flag Antikörper M2 und Protein-G Agarose Beads der Ligand samt gebundenem Rezeptorsignalkomplex aus Zelllysaten präzipitiert und mittels Westernblot analysiert. Die Ubiquitinylierung von RIP1 (im anti-RIP1 Westernblot erkennbar als „schmierige“ Banden) nach Flag-TNC-TL1A Stimulation wurde durch die Inhibition von TAK1 nicht beeinflusst (Abbildung 11 A). Die Depletion von cIAP1/2 durch BV6 hingegen resultierte erwartungsgemäß in einer signifikanten Reduzierung Ubiquitinylierung und intensiveren Detektion von nicht-ubiquitinyliertem RIP1. Nach Inhibition von TAK1 hatte DR3 Stimulation sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Caspase-Aktivität eine starke zytotoxische Wirkung (Abbildung 11 B). Da Komplex Iib RIP1-abhängig Apoptose ebenso wie Nekroptose auslösen kann, ist diese Beobachtung im Einklang mit den Erkenntnissen, die TNF/TNFR1 System gewonnen wurden. Die Inhibition von RIP1 und MLKL mittels Nec-1s bzw. NSA konnte DR3-induzierte Nekroptose in TAK1i/zVAD-fmk-behandelten Zellen vollends blockieren (Abbildung 11 B).

DR3 Stimulation von CHX/zVAD-fmk-behandelten TF-1 Zellen induzierte Nekroptose (Abbildung 8 I). Außerdem konnte in BV6-behandelten TF-1 Zellen apoptotischer Zelltod durch Flag-TNC-TL1A ausgelöst werden (Abbildung 7 D und Abbildung 11 C). Interessanterweise konnte jedoch nach Caspase-Inhibition und BV6-Behandlung keine Nekroptose in TF-1 Zellen durch DR3 Stimulation eingeleitet werden (Abbildung 11 C). Auch Nekroptose-Induktion über TNF/TNFR1 war unter diesen Bedingungen nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Der Grund hierfür war vermutlich eine aufrechterhaltene RIP1 Ubiquitinylierung aufgrund ineffektiver cIAP1 Depletion nach BV6 Behandlung (Abbildung 11 D). Die Inkubation von TF-1 Zellen mit den SMAC Mimetika LCL161 und Birinapant erbrachte ebenfalls keine effiziente cIAP1 Degradation. Der trotzdem beobachtete zytotoxische Effekt von BV6/Flag-TNC-TL1A (Abbildung 11 C) kam vermutlich durch BV6-vermittelte Degradation des Caspase-Inhibitors XIAP zustande [183].

Nichtsdestotrotz sollte theoretisch, ungeachtet des RIP1 Ubiquitinylierungsstatus, die Induktion von Nekroptose unter TAK1- und Caspase-Inhibition über TL1A/DR3 möglich sein. Tatsächlich konnte durch TAK1i/zVAD-fmk/Flag-TNC-TL1A Behandlung auch in TF-1

Zellen Caspase-unabhängiger Zelltod induzieren werden (Abbildung 11 E). Die Inhibition der Kinasen RIP1 und RIP3 mittels Nec-1s bzw. GSK'872 protektierte TF-1 Zellen vor TAK1i/zVAD-fmk/Flag-TNC-TL1A-initiiertem Zelltod und lässt damit Nekroptose als ablaufenden Zelltodmechanismus erkennen. Die relativ geringe Zelltodrate in TF-1 Zellen unter nekroptotischen Bedingungen, im Vergleich mit Ku812F Zellen, ist vermutlich auf die niedrige RIP3 Expression dieser Zellen zurückzuführen (Abbildung 9 A).

Die erhobenen Daten aus Abbildung 11 verdeutlichen, dass DR3-induzierter (nekroptotischer) Zelltod, ähnlich wie TNFR1-induzierter Zelltod, durch die Kinase TAK1 kontrolliert wird. Nicht die Ubiquitinylierung von RIP1 *per se*, sondern die Rekrutierung von TAK1 an das Polyubiquitin-Netzwerk und die Aktivität der Kinase am Rezeptorsignalkomplex sorgen demnach für die Blockade DR3-vermittelter Apoptose bzw. Nekroptose.





**Abbildung 11.** TAK1 reguliert DR3-induzierten Zelltod.

A) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3  $\mu$ M) oder dem TAK1 Inhibitor (TAK1i) (5Z)-7-oxozeaenol (0,8  $\mu$ M) für 1 h inkubiert und anschließend für 10 min mit Flag-TNC-TL1A (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und dann mittels anti-Flag Antikörper eine Immunpräzipitation über den Liganden durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden zusammen mit den korrespondierenden Zelllysaten über SDS-PAGE und Westernblot analysiert. B) Ku812F Zellen wurden mit TAK1i (0.8  $\mu$ M), zVAD-fmk (100  $\mu$ M), Nec-1s (30  $\mu$ M) und NSA (25  $\mu$ M) für 1 h inkubiert und im Anschluss mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A für 4 h stimuliert. Die Zellviabilität wurde durch MTT-Färbung (weitere 2 h) bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. C) TF-1 Zellen wurden mit BV6 (10  $\mu$ M, 2 h) und zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) inkubiert und mit Flag-TNC-TL1A stimuliert. Die Zellviabilität wurde durch MTT-Färbung 18 h nach Stimulation bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. D) TF-1 Zellen wurden mit den SMAC Mimetika BV6, LCL161 und Birinapant (jeweils 10  $\mu$ M) für 2 h inkubiert. Die cIAP1-Proteinlevel der Zelllysate wurden über Westernblot untersucht. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle. E) TF-1 Zellen wurden mit TAK1i (3  $\mu$ M), zVAD-fmk (100  $\mu$ M), Nec-1s (30  $\mu$ M) und GSK'872 (8  $\mu$ M) für 1 h vorbehandelt und anschließend mit Flag-TNC-TL1A in unterschiedlicher Konzentration für 4 h stimuliert. Die Zellviabilität wurde durch MTT-Färbung (weitere 2 h) bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten.

#### 4.2.6 TL1A/DR3-initiierte Nekroptose wird von ROS Produktion begleitet

In zahlreiche Studien wurde bereits Nekroptose-assoziierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen [57, 86, 100, 184, 185]. Die funktionelle Relevanz von auftretenden ROS wird allerdings, besonders im Hinblick auf TNF-induzierte Nekroptose, kontrovers diskutiert [186]. Daher wurde erforscht, ob ROS bei TL1A/DR3-initiiertem Nekroptose auftreten und evtl. eine funktionelle Relevanz aufweisen.

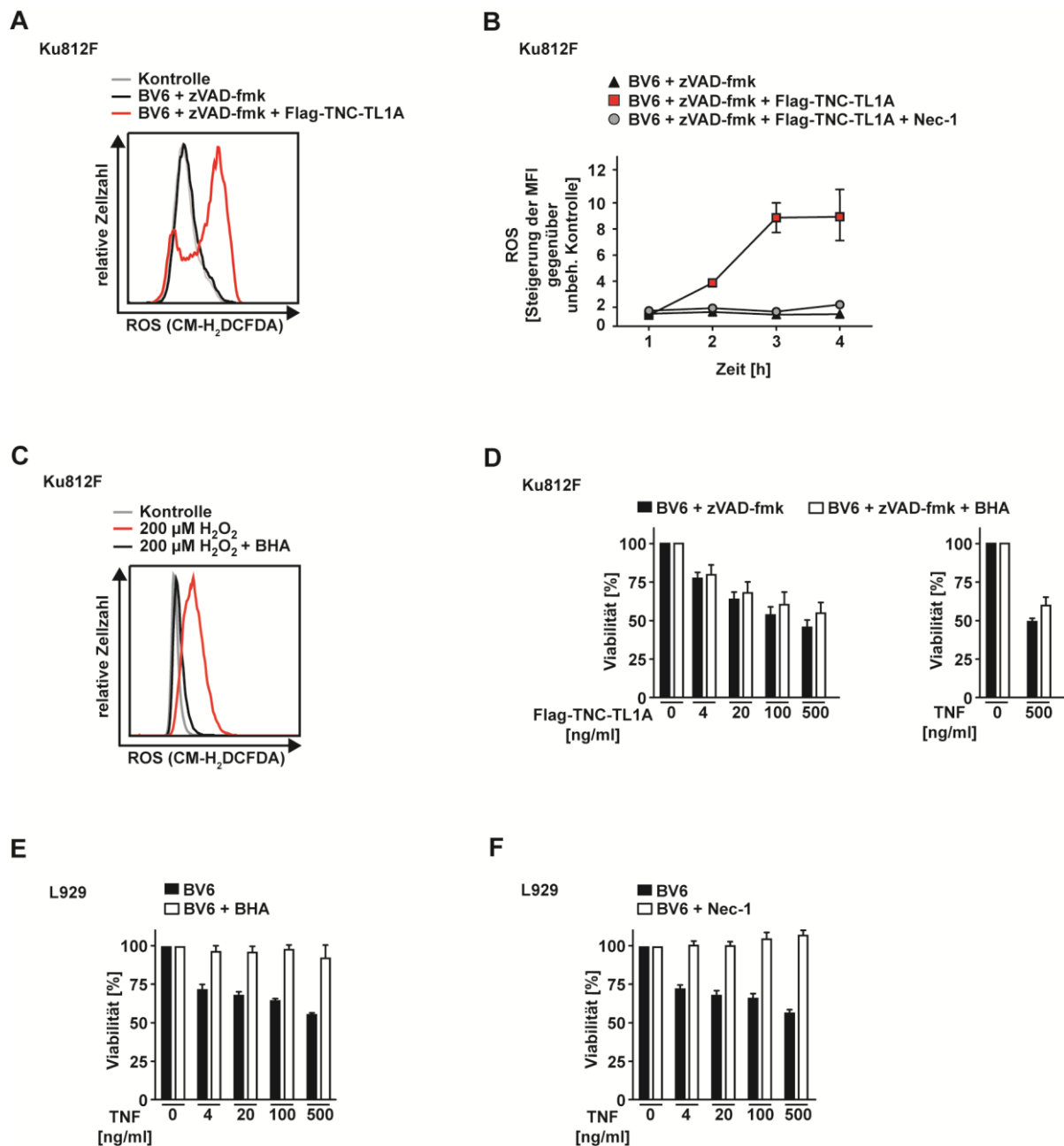
Für die Messung intrazellulärer ROS wurde das ROS-Detektionsreagenz CM-H<sub>2</sub>DCFDA verwendet. Dieses zellpermeable Reagenz wird intrazellulär von Esterasen modifiziert, was zum Verbleib des Farbstoffs in der Zelle führt. Bei auftretenden ROS wird dieser Farbstoff intrazellulär oxidiert, wodurch seine Fluoreszenz gesteigert wird. Die Fluoreszenzsteigerung kann über Fluoreszenz-Mikroskopie oder Durchflusszytometrie gemessen werden und gibt dabei Aufschluss, ob in der Zelle Oxidation des Farbstoffes stattgefunden hat.

In BV6/zVAD-fmk-behandelten Ku812F Zellen konnte nach Flag-TNC-TL1A Stimulation eine Steigerung des CM-H<sub>2</sub>DCFDA Fluoreszenz-Signals gemessen werden, was auf die Produktion von ROS hindeutete (Abbildung 12 A). Der Produktion von ROS erreichte 3 Stunden nach Stimulation den Höhepunkt und konnte durch die Vorinkubation der Zellen mit Nec-1 komplett inhibiert werden (Abbildung 12 B). Die Bildung von ROS ist demnach von der RIP1-Kinaseaktivität abhängig.

Die Vorinkubation von Ku812F Zellen mit dem Radikalfänger bzw. ROS-Scavenger Butylhydroxyanisol (BHA) konnte effizient die Oxidation des ROS-Detektionsreagenz, ausgelöst durch exogene Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, verhindern (Abbildung 12 C). Allerdings wurde der zytotoxische Effekt von Flag-TNC-TL1A in Ku812F Zellen unter nekroptotischen Bedingungen durch Vorbehandlung der Zellen mit BHA nicht beeinflusst (Abbildung 12 D). Gleichmaßen zeigte die BHA-Behandlung der Zellen keinen Effekt auf nekroptotischen Zelltod, der über TNFR1 Stimulation eingeleitet wurde (Abbildung 12 D).

Um ineffiziente ROS Neutralisation durch BHA ausschließen zu können, wurde ein zusätzliches, ROS-abhängiges Zellkulturmodell gewählt. Die Stimulation der Fibrosarkom-Zelllinie L929 mit TNF leitet in diesen Zellen selbst in Abwesenheit von Caspase-Inhibitoren und Inhibitoren der Proteinbiosynthese Nekroptose ein [187]. Der Ablauf von Nekroptose in cIAP1/2-depletierten L929 Zellen ist von der Produktion bzw. Anwesenheit von ROS abhängig [57]. In diesem Zellmodell war die Vorinkubation mit BHA und Nec-1 in gleichem Maße protektiv gegenüber TNF-induzierter Nekroptose (Abbildung 12 E und F). Daher ist eine ineffiziente ROS Neutralisation höchst unwahrscheinlich. Die Verwendung anderer ROS-Scavenger wie Butylhydroxytoluol und  $\alpha$ -Tocopherol hatte ebenfalls keinen Einfluss auf DR3-induzierte Nekroptose (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend legen die Daten nahe, dass TL1A/DR3-vermittelte Nekroptose die Bildung von ROS mit sich bringt, der Ablauf des Zelltodprogrammes aber nicht davon abhängig ist. Es muss allerdings eingeräumt werden, dass die ROS-Abhängigkeit von Nekroptose je nach Zelltyp variieren kann [186].



**Abbildung 12.** DR3-vermittelte Nekroptose wird von ROS Produktion begleitet.

A) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3 µM, 2 h) und zVAD-fmk (100 µM, 1 h) inkubiert und dann mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) stimuliert. 90 min nach Stimulationsbeginn wurde CM-H<sub>2</sub>DCFDA (5 µM) zugegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und die Fluoreszenz der Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei durchgeführte Experimente. B) Ku812F Zellen wurden wie unter A) beschrieben mit BV6 und zVAD-fmk behandelt und mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) für die angegebenen Zeitspannen stimuliert oder ohne Ligand inkubiert. Die Zugabe von Nec-1 (100 µM) erfolgte 1 h vor Stimulation mit Flag-TNC-TL1A. Direkt im Anschluss wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und die Fluoreszenz am Durchflusszytometer analysiert.

Der Anstieg von ROS wurde durch Division der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) behandelter Zellen durch die MFI unbehandelter Zellen berechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. C) Ku812F Zellen wurden in Ab- und Anwesenheit von BHA (100  $\mu$ M) mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200  $\mu$ M) für 20 min inkubiert und die CM-H<sub>2</sub>DCFDA Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen. D) Ku812F Zellen wurden mit BV6 (3  $\mu$ M, 2 h), zVAD-fmk (100  $\mu$ M, 1 h) und BHA (100  $\mu$ M, 1 h) behandelt und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TNC-TL1A oder TNF für 4 h stimuliert. Die Zellviabilität wurde durch MTT-Färbung (weitere 2 h) bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. E) und F) L929 Zellen wurden mit BV6 (2.5  $\mu$ M, 2 h) und BHA (100  $\mu$ M, 1 h) oder Nec-1 (100  $\mu$ M, 1 h) inkubiert und mit den angegebenen Konzentrationen an TNF stimuliert. Die Zellviabilität wurde durch MTT-Färbung bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten.

Die in diesem Abschnitt 4.2 zusammengefassten Ergebnisse zu TL1A/DR3-induzierter Nekroptose wurden in der Fachzeitschrift *Cellular and Molecular Life Sciences* publiziert [188].

### 4.3 DR3-Signaltransduktion auf regulatorischen T-Zellen

#### 4.3.1 DR3 Expression auf humanen Tregs

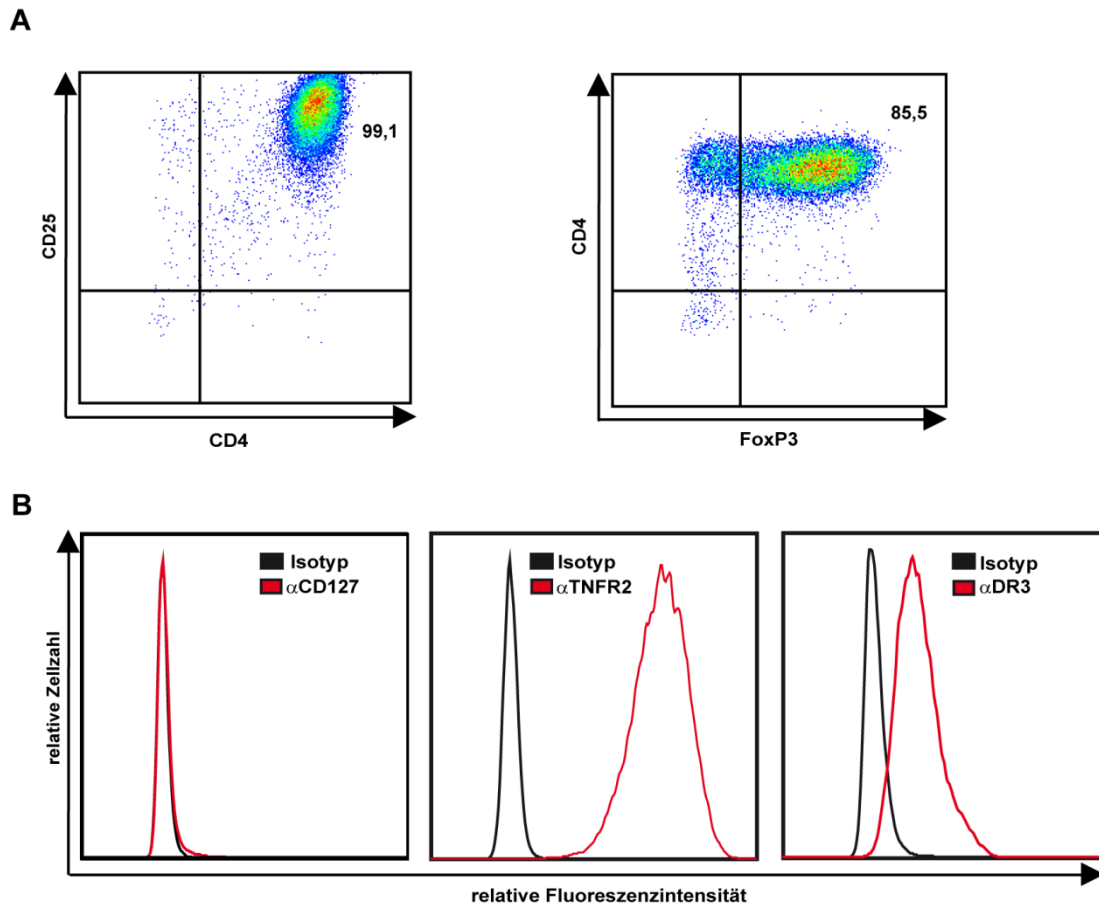
DR3 wird hauptsächlich auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen exprimiert. Während DR3 Expression bei konventionellen T-Zellen vor allem nach Aktivierung detektierbar wird, weisen regulatorische T-Zellen der Maus eine konstitutive Expression von DR3 auf [159]. Durch Behandlung von Mäusen mit einem agonistischem anti-DR3 Antikörper oder einen TL1A-Ig Fusionsprotein konnten spezifisch Tregs *in vivo* zur Proliferation angeregt werden. Induzierte erhöhte Treg-Level in den Mäuse hatten (gewünschte) protektive Effekte in unterschiedlichen Modellen der Autoimmunität und sogar in einem Herz-transplantationsmodell zur Folge [159-161]. Aufgrund der limitierten DR3 Expression könnte die Modulation dieses Rezeptorsignalwegs eine zielgerichtete und nebenwirkungsarme therapeutische Interventionsmöglichkeit der Zukunft darstellen. Allerdings existierte für humane Tregs bislang kein Nachweis der DR3 Expression auf der Zelloberfläche bzw. der Responsivität gegenüber dem Liganden TL1A. Aus diesem Grund sollten Tregs aus dem Blut freiwilliger Spender isoliert und bzgl. des TL1A/DR3-Systems charakterisiert werden.

Zunächst wurden dafür mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) der Spender isoliert. Zur Anreicherung humaner Tregs aus aufgereinigten PBMCs wurde ein CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup> Treg-Isolationskit (Miltenyi Biotec) verwendet. Die Isolation wird dabei über eine erste negative Selektion und eine zweite positive Selektion durchgeführt. Bei der negativen Selektion wurde durch Zugabe biotinylierter Antikörper (anti-CD8, anti-CD19, anti-CD127, anti-CD123) alle CD4-negativen und auch aktivierte, CD127- positive T-Zellen markiert und mittels Streptavidin-gekoppelter, magnetischer Beads und über eine Magnetsäule abgereichert. Aus der übrig gebliebenen CD4-positiven Population wurde dann im zweiten Schritt über magnetische anti-CD25 Beads die CD25 exprimierenden Zellen angereichert. Die isolierten Zellen wurden dann zwei bis drei Wochen über anti-CD3/anti-CD28 Stimulation unter Zugabe von IL-2 expandiert um eine ausreichende Zellzahl für experimentelle Untersuchungen zu generieren. Zusätzlich wurde die Zellen während der Expansion mit dem mTOR1 Inhibitor Rapamycin versetzt. Durch Rapamycin Behandlung wird spezifisch die Proliferation von Tregs ermöglicht, wohingegen evtl. kontaminierende konventionelle T-Zellen an der Proliferation gehindert werden [189-191]. Ferner weisen *in vitro* expandierte Tregs unter Rapamycin einen geringeren Verlust der FoxP3 Expression auf und erhalten ihre Funktionalität auch bei repetitiver T-Zellrezeptor Stimulation während einer Expansion [192].

Während der Expansion wurde die Expression charakteristischer Treg-Marker analysiert um sicherzustellen, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Tregs handelte. Abbildung 13 zeigt die Charakterisierung der Zellen an Tag 9 einer Expansion. Der T-Zell Co-Rezeptor CD4 und die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors, CD25, wurden bei allen Expansionen von fast allen Zellen exprimiert (Abbildung 13 A). Der Transkriptionsfaktor FoxP3 wurden ebenfalls von dem Großteil der Zellen exprimiert. Allerdings wurde, wie in der Literatur beschrieben [193], die Abnahme der FoxP3 Expression mit zunehmender Expansionsdauer festgestellt. Die CD127 Expression korreliert invers mit der Suppressivität von T-Zellen und wird dementsprechend nicht von Tregs, jedoch von aktivierten konventionellen T-Zellen exprimiert [147]. Daher wurden auch CD127-positive Zellen bei der negativen Selektion

angereichert. CD127 war auf der Oberfläche der expandierten Tregs nicht zu detektieren. (Abbildung 13 B). TNFR2 hingegen, ein charakteristischer Marker humaner Tregs [149], wurde auf der Zelloberfläche exprimiert. Die An- bzw. Abwesenheit der beschriebenen Proteine belegen, dass es sich bei der angereicherten und expandierten Zellpopulation um tatsächlich um Tregs handelte.

DR3 Expression konnte ebenfalls erstmalig auf humanen Tregs nachgewiesen werden (Abbildung 13 B). Diese Erkenntnis warf gleichzeitig die Frage auf, welche Signalwege DR3 auf diesem Zelltyp aktivieren kann.



**Abbildung 13.** Charakterisierung expandierter Tregs.

PBMCs eines Spenders wurden isoliert und daraus mit Hilfe eines  $CD4^+CD25^+CD127^{dim/-}$  Treg-Isolationskit (Miltenyi Biotec) Tregs aufgereinigt. Danach wurden die Zellen für 9 Tage über anti-CD3/anti-CD28 und IL-2 (500 U/ml) Stimulation expandiert. Zusätzlich wurde das Medium mit Rapamycin (1  $\mu$ M) versetzt. A) Die Zellen wurden mit spezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern auf CD4 und CD25 gefärbt. Danach wurde eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen für die Detektion von intrazellulärem FoxP3 mit einem FoxP3-Staining Kit (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Die Expression der Treg-Marker wurde am FACS Canto II Durchflusszytometer analysiert. Die Einstellung der Gates wurde unter Verwendung von passenden Isotyp-Kontrollen durchgeführt. B) Die Oberflächenexpression von CD127, TNFR2 und DR3 wurde mittels spezifischer Antikörper und unter Verwendung korrespondierender Isotyp-Kontrollen am Durchflusszytometer analysiert. Die abgebildeten Daten aus A) und B) wurden mit den Zellen einer Expansion (von einem Spender) generiert und zeigen beispielhaft die Charakterisierung der isolierten Tregs.

#### 4.3.2 DR3 aktiviert intrazelluläre Signalwege in Tregs

Um die Funktionalität von DR3 auf humanen Tregs zu untersuchen, wurden Tregs isoliert und mittels anti-CD3/anti-CD28 und IL-2 (500 U/ml) Stimulation expandiert. Nach zwei oder drei Wochen wurden die expandierten Zellen mit Flag-TNC-TL1A über verschiedene Zeitpunkte hinweg stimuliert und über SDS-PAGE und Westernblot intrazelluläre Signalwege analysiert. Gleichzeitig wurde eine TNFR2 Stimulation durchgeführt. Dafür wurde Flag-TNC-scTNF(143N/145R), eine TNFR2 spezifische nonamere TNF Variante, verwendet [194].

Die Mitogenaktivierten Proteinkinasen p38, ERK1/2 (auch bekannt als p44/p42) sowie JNK haben Bedeutung für unterschiedlichste zelluläre Prozesse wie Zelldifferenzierung, Wachstum, Proliferation und Apoptose. Alle drei Kinasen werden in TF-1 Zellen nach DR3 Stimulation aktiviert [126] und wurden daher als potentielle Kandidaten auch in Tregs untersucht.

Die Stimulation von DR3 mit Flag-TNC-TL1A resultierte, ebenso wie die Stimulation von TNFR2 mit Flag-TNC-scTNF(143N/145R), in Phosphorylierung bzw. Aktivierung der Kinase p38 (Abbildung 14 A und B). Der verwendete Antikörper erkennt aktivierende Phosphorylierung der p38 Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  an Thr180/Tyr182.

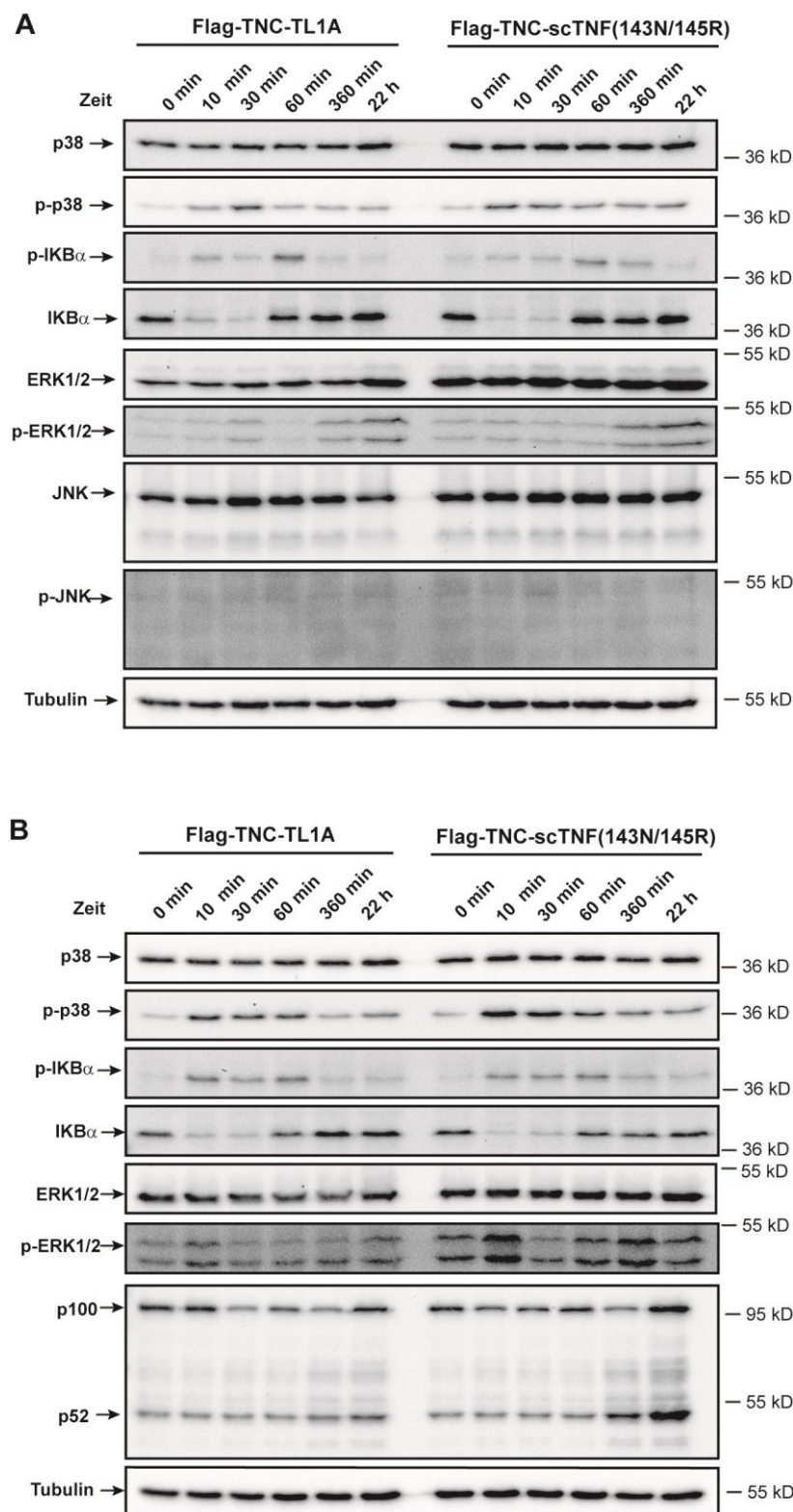
Die Aktivierung der Kinasen ERK1/2 erfolgte biphasisch 10 bis 30 min bzw. 360 min nach Flag-TNC-TL1A Stimulation (Abbildung 14 A und B). Im Falle von Flag-TNC-scTNF(143N/145R) war ebenfalls eine verstärkte ERK1/2 Phosphorylierung erkennbar (Abbildung 14 B). Der verwendete Antikörper erkennt Phosphorylierung von ERK1 an Thr202 und Tyr204 sowie von ERK2 an Thr185 und Tyr187.

Eine Phosphorylierung von JNK wurde an den untersuchten Zeitpunkten nicht detektiert (Abbildung 14 A).

Die NF $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren werden im Zytosol von den I $\kappa$ B Proteinen komplexiert und dadurch inaktiviert. Die Phosphorylierung der I $\kappa$ B Proteine an Ser32 und Ser36 leitet deren proteasomalen Abbau und damit die Freisetzung der NF $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren ein. Die Stimulation von Tregs mit Flag-TNC-TL1A und auch mit Flag-TNC-scTNF(143N/145R) induzierte bereits nach 10 min diese Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  (Abbildung 14 A und B). Dementsprechend folgte der Phosphorylierung eine Abnahme der zellulären I $\kappa$ B $\alpha$  Proteinmenge, was auf den Abbau des Inhibitors hindeutet. Die Dauer der Expansion von zwei (Abbildung 14 A) oder drei Wochen (Abbildung 14 B) hatte keinen Einfluss auf DR3-induzierte Signalwege, wie die Daten zu p38 oder NF $\kappa$ B Aktivierung zeigen. Neben dem konventionellen/kanonischen existiert auch ein alternativer/nicht-kanonischer NF $\kappa$ B Signalweg. Dieser alternative Weg wird beispielsweise durch TWEAK/Fn14 [195] oder TNF/TNFR2 [194] initiiert und führt zur Aktivierung NIK (*NF $\kappa$ B inducing kinase*). NIK phosphoryliert IKK $\alpha$ / $\beta$ , IKK $\alpha$ / $\beta$  phosphoryliert daraufhin das NF $\kappa$ B2 Vorläuferprotein p100. Dadurch markiert, wird p100 proteasomal zu p52 prozessiert. p52 bildet schließlich mit RelB den finalen Transkriptionsfaktor des alternativen NF $\kappa$ B Signalweges. Die Stimulation von TNFR2 führte erwartungsgemäß zu einer Abnahme der p100 Proteinmenge nach 360 min. Gleichzeitig konnte eine Zunahme des prozessierten Proteins p52 beobachtet werden, was auf alternative NF $\kappa$ B Aktivierung schließen lässt (Abbildung 14 B). Die langfristige Dauer dieses Vorganges entspricht den Daten aus vorhergehenden Studien [195]. Nach Flag-TNC-TL1A Stimulation konnte keine Zunahme des p52 Signals detektiert werden.

Diese Beobachtung spricht gegen eine DR3-vermittelte Aktivierung des alternativen NF $\kappa$ B Signalweges.

Zusammenfassend demonstrieren die Daten aus Abbildung 14, dass DR3 auf humanen Tregs ein funktioneller Rezeptor ist, der nach Ligandenbindung die Aktivierung der MAPK Kinasen p38 und ERK1/2 sowie des kanonischen NF $\kappa$ B Signalweges vermittelt.



**Abbildung 14.** DR3 aktiviert intrazelluläre Signalwege in humanen Tregs.

Tregs eines Spenders wurden isoliert und für zwei Wochen (A) bis drei Wochen (B) über anti-CD3/anti-CD28 und IL-2 (500 U/ml) Stimulation expandiert. Anti-CD3/ anti-CD28 Beads wurden entfernt und Zellen über Nacht ohne IL-2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) oder Flag-TNC-scTNF(143N/-145R) (200 ng/ml) für die angegebenen Zeitspannen stimuliert. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und mittels SDS-PAGE und Westernblot unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei durchgeführte Treg-Expansionen und Stimulationen von drei unterschiedlichen Spendern.



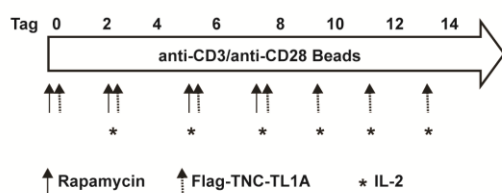
#### 4.3.3 DR3-Signaltransduktion fördert die Proliferation von Tregs *in vitro*

Die Injektion eines agonistischen anti-DR3 Antikörpers induziert die Proliferation von Tregs *in vivo* [159, 161, 162]. Allerdings könnte eine mögliche therapeutische Anwendung von anti-DR3 Antikörpern limitiert sein. Zum einen können bei Injektion eines Antikörpers Fc-Rezeptor-abhängige zytotoxische Effekte auftreten. Zum anderen benötigen agonistische Antikörper gegen TNF Rezeptoren manchmal zusätzlich Fc-Rezeptor-Bindung um das vollständige Aktivierungspotenzial auszureizen [14]. Daher sollte untersucht werden, ob humane Tregs durch Interaktion mit dem physiologischen DR3 Liganden TL1A *in vitro* zur Proliferation angeregt werden können.

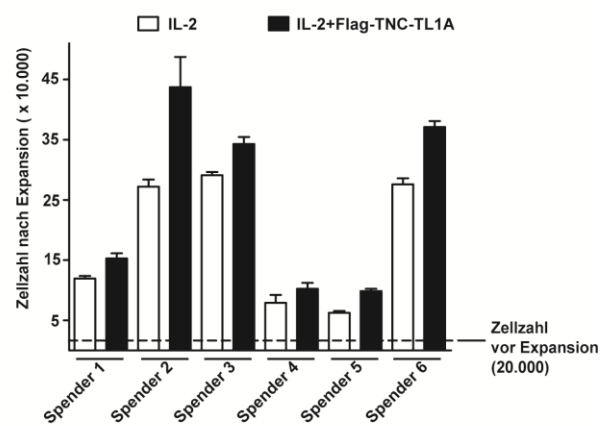
Durch Stimulation von Tregs mit Flag-TNC-TL1A in Anwesenheit von TCR Stimulation bei gleichzeitiger Abwesenheit von IL-2 konnte keine Zellteilung eingeleitet werden (Daten nicht gezeigt). Die Abhängigkeit der DR3-induzierten T-Zellproliferation von IL-2 wurde bereits in murinen Zellen demonstriert [121, 159]. Daher wurden isolierte Tregs aus 6 Spendern unter T-Zellrezeptor Stimulation (anti-CD3/anti-CD28 Beads), IL-2 und Rapamycin in Ab- und Anwesenheit von Flag-TNC-TL1A expandiert und nach 14 Tagen die Zellzahl bestimmt. Der experimentelle Ablauf ist in Abbildung 15 A schematisch dargestellt. Interessanterweise konnte durch Zugabe von Flag-TNC-TL1A die Proliferationsrate von Tregs gesteigert werden. Alle untersuchten *ex vivo* Treg-Kulturen wiesen nach zweiwöchiger Expansion unter Flag-TNC-TL1A eine erhöhte absolute Zellzahl auf (Abbildung 15 B). Die Proliferation der Tregs konnte durch Anwesenheit von Flag-TNC-TL1A um 17 bis 60 Prozent gesteigert werden (Abbildung 15 C).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die DR3-vermittelte gesteigerte Proliferation die Funktionalität bzw. Suppressivität der Tregs beeinflusst. Dazu wurden Tregs von drei Spendern nach der Zählung für zwei Tage ohne TCR Stimulation und IL-2 bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und in einem sog. Suppressions-Assay eingesetzt (siehe 3.2.10). Dabei wurden autologe PBMCs mit CFDA-SE markiert. Bei Zellteilung wird dieser Farbstoff auf die Tochterzellen aufgeteilt, was zur Halbierung des initialen Fluoreszenz-Signals führt. Auf diese Weise kann die Proliferation von Zellen über die Detektion des Fluoreszenz-Signals nachgewiesen und nachverfolgt werden. Nach der zweitägigen Ruhepause wurden Tregs mit CFDA-SE-gefärbten PBMCs im Verhältnis 1:2, 1:4 und 1:8 in Anwesenheit von anti-CD3/anti-CD28 Beads für 4 Tage co-kultiviert. Danach wurden die anti-CD3/anti-CD28 Beads entfernt und die gesamte Co-Kultur auf CD3 und CD8 gefärbt (Abbildung 15 D). Die Färbung diente der Identifizierung der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, da diese eine potenzielle Zielpopulation für Tregs darstellen. Das CFSE Signal der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde am Durchflusszytometer analysiert. Ohne anti-CD3/anti-CD28 Stimulation wurde erwartungsgemäß keine Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert (Abbildung 15 D). Wurden den PBMCs anti-CD3/anti-CD28 Beads zur Aktivierung der Proliferation beigesetzt, vollzogen CD8<sup>+</sup> T-Zellen bis zu sieben Teilungen (Abbildung 15 E, Bild 1). Die Zugabe von Tregs im Verhältnis 1:2 und 1:4 hingegen blockierte die Teilung der CD8<sup>+</sup> Zellen vollständig (Abbildung 15 E, Bild 2 und 3). Erwartungsgemäß konnte bei geringerer Anzahl an Tregs im Experiment ein Teil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen proliferieren (Abbildung 15 E, Bild 4). Wurden den PBMCs statt der Tregs als Kontrolle konventionelle CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen beigesetzt, konnten die zytotoxischen T-Zellen unbeeinflusst proliferieren (Abbildung 15 E, Bild 5).

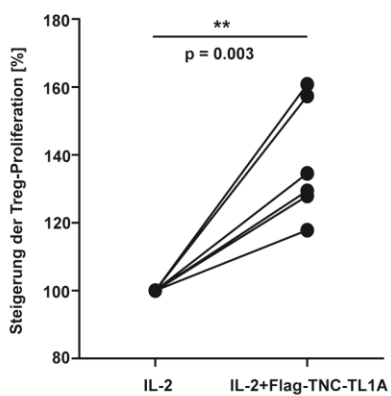
A



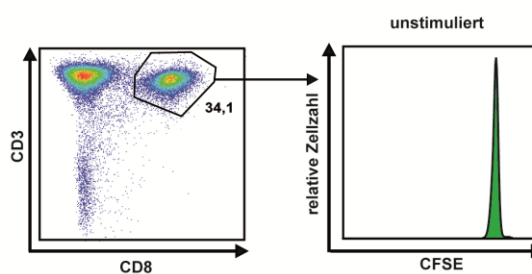
B



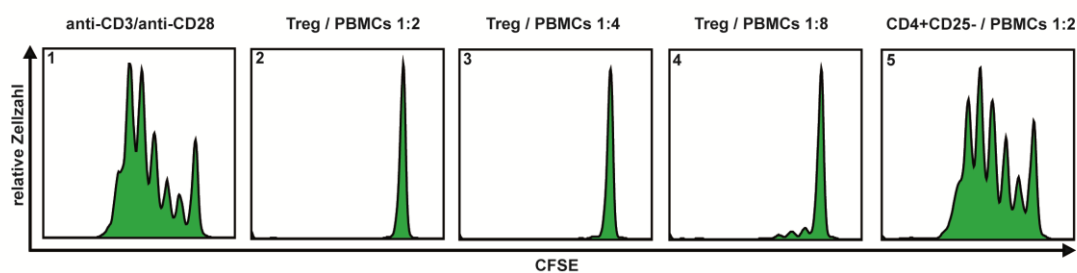
C



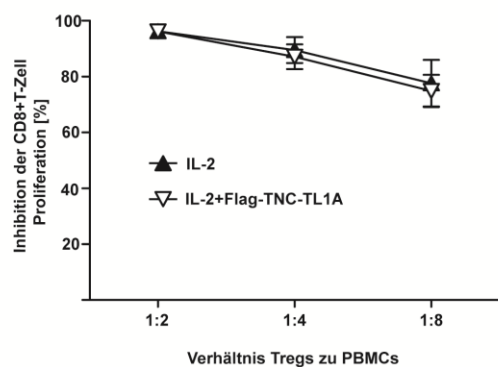
D



E



F



**Abbildung 15.** DR3-Signaltransduktion steigert Treg Proliferation *ex vivo*

A) Schematische Darstellung des Treg-Proliferationsassays. B) PBMCs eines Spenders wurden isoliert und daraus mit Hilfe eines CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup> Treg-Isolationskit (Miltenyi Biotec) Tregs aufgereinigt. Die Tregs (20.000 pro Well einer 96-Well Rundbodenplatte) wurden direkt nach der Isolation mit Rapamycin (1 µM) versetzt und mit anti-CD3/anti-CD28 Beads (Verhältnis Zellen zu Beads 1:2) in An- oder Abwesenheit von Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) stimuliert. Am zweiten Tag nach der Isolation wurde IL-2 (200 U/ml) zugesetzt. Alle 2-3 Tage wurde die Hälfte des Mediums gewechselt, wobei das frische Medium mit IL-2 (100 U/ml) ± Flag-TNC-TL1A (200 ng/ml) versetzt wurde. Am Tag 14 der Expansion wurden die anti-CD3/anti-CD28 Beads magnetisch entfernt und die absolute Zellzahl bestimmt. Die Expansion der Tregs wurde in 3 bis 5 technischen Replikaten durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte der gezählten absoluten Zellzahlen ± SEM. C) Die prozentuale Steigerung der Proliferation wurde durch Division der Mittelwerte der absoluten Zellzahlen berechnet. Zur statistischen Auswertung wurde ein Einstichproben-t-Test ( $p < 0,05$ ) mittels GRAPHPAD PRISM5 durchgeführt. D) und E) In An- und Abwesenheit von Flag-TNC-TL1A expandierte Tregs wurden zwei Tage ohne TCR-Stimulation und IL-2 inkubiert. Autologe PBMCs wurden mit dem CFDA SE Cell Tracer Reagenz (5 µM) markiert. Anschließend wurden Tregs mit PBMCs im Verhältnis 1:2, 1:4 und 1:8 mit anti-CD3/anti-CD28 Beads inkubiert. Als Kontrolle wurden zum einen PBMCs alleine ± anti-CD3/anti-CD28 Beads, zum anderen PBMCs mit autologen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen und anti-CD3/anti-CD28 Beads inkubiert. Nach 4 Tagen wurden die Beads entfernt und die gesamte Co-Kultur auf CD3 und CD8 gefärbt. Die CFSE Fluoreszenz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden dann am Durchflusszytometer analysiert. Die angegebenen Daten zeigen repräsentativ die Auswertung eines Treg-Funktionalitätstests, der für IL-2 ± Flag-TNC-TL1A expandierte Tregs von drei Spendern durchgeführt wurde. F) Die prozentuale Inhibition der CD8<sup>+</sup> T-Zell Proliferation durch IL-2 ± Flag-TNC-TL1A expandierte Tregs wurde mit Hilfe des Programms FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, USA) und der Divisionsindex-Methode berechnet. Die angegebenen Werte zeigen die mittlere Suppressive-Aktivität ± SEM von IL-2 ± Flag-TNC-TL1A expandierten Tregs aus drei unterschiedlichen Spendern.

Durch diese Experimente konnte die inhibitorische Aktivität der expandierten Tregs nachgewiesen werden. Diese Daten unterstützen zudem die phänotypische Charakterisierung der isolierten Zellen und beweisen, dass es sich bei der expandierten Population tatsächlich um funktionelle regulatorische T-Zellen handelt.

Tregs von drei unterschiedlichen Spendern wiesen, egal ob in An- oder Abwesenheit von Flag-TNC-TL1A expandiert, die gleiche suppressive Aktivität auf (Abbildung 15 F). Die suppressive Aktivität wurde wie folgt bestimmt. Zuerst wurde mit dem Softwareprogramm FlowJo ein Divisionsindex für jede Bedingung berechnet, der die durchschnittliche Teilung einer Zelle in der Population beschreibt. Mit diesen Werten wurde dann, wie in der Literatur beschrieben [164], die prozentuale Inhibition CD8<sup>+</sup> T-Zell Proliferation durch die Tregs berechnet.

Das TL1A/DR3 Ligand-Rezeptor System hat den Daten zufolge einen positiven Effekt auf die Proliferation von humanen Tregs. Die Befunde dieser *ex vivo* Experimente mit humanen Tregs sind damit konform mit den Befunden, die in vorangegangenen Mausstudien *in vivo* beschrieben wurden. Die Daten zeigen zudem, dass neben agonistischen Antikörpern auch der physiologische Ligand TL1A das Potenzial zur DR3-vermittelten Treg-Expansion mitbringt. Die gesteigerte Proliferation der Tregs beeinflusst ihre Funktionalität, bezogen auf Inhibition der Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, dagegen nicht.

## **5. Diskussion**

In dieser Arbeit wurden grundlegende Mechanismen der DR3 Signaltransduktion untersucht. Zuerst wurde die Frage geklärt, ob zur Aktivierung von DR3 membranständiges bzw. oligomerisiertes TL1A nötig oder lösliches, trimeres TL1A ausreichend ist. Dabei wurde festgestellt, dass trimeres TL1A das volle Aktivierungspotential für DR3 besitzt und eine höhere Oligomerisierung von TL1A keinen Einfluss auf die Rezeptoraktivierung hat. Der trimere Ligand kann sowohl pro-inflammatorische Signalwege als auch Zelltod auf unterschiedlichen Zellen einleiten.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass DR3 nach Interaktion mit TL1A neben Apoptose auch Caspase-unabhängige Nekroptose auszulösen vermag. Voraussetzung hierfür ist die Depletion von IAPs, die Inhibition der TAK1 Kinase oder der Proteinbiosynthese. DR3-induzierte Nekroptose beinhaltet die Formation des Nekrosoms sowie die Aktivierung der Pseudokinase MLKL. Zur Aufrechterhaltung der Proteinstabilität von RIP1, RIP3 und MLKL und dem Ablauf von DR3-vermittelter Nekroptose wird die Aktivität des Chaperon HSP90 benötigt. DR3-vermittelte Nekroptose führt intrazellulär zum Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies. Diese scheinen jedoch den Ablauf von Nekroptose nicht zu beeinflussen.

Vorangegangene Studien, in denen DR3 vermittelte Treg-Expansion *in vivo* zur Eindämmung autoreaktiver Immunantworten genutzt wurde, deuten vielversprechendes therapeutisches Potential dieses Rezeptors an. Erstmals wurde in dieser Arbeit die Expression von DR3 auf humanen Tregs beschrieben und intrazelluläre Signalwege des Rezeptors auf diesem Zelltyp identifiziert. Die Proliferationsrate von humanen Tregs konnte *ex vivo* durch TL1A gesteigert werden. Dabei wurde keine Beeinträchtigung der Funktionalität bzw. Suppressivität festgestellt.

Zusammengefasst wurden in dieser Arbeit molekulare Mechanismen der DR3 Signaltransduktion charakterisiert und erstmals die Funktionalität von DR3 auf humanen Tregs beschrieben.

### **5.1 Lösliches TL1A ist zur DR3 Aktivierung ausreichend**

Das TL1A/DR3 Ligand-Rezeptor-System wurde als potenzielles therapeutisches Angriffsziel für unterschiedlichste Anwendungen und Fragenstellungen untersucht. Die meisten Daten basieren dabei auf Mausmodellen, bei denen Rezeptor oder Ligand durch genetische Deletion entfernt wurde [123, 124, 132, 135], oder unter Verwendung agonistischer Antikörper DR3 auf T-Zellen aktiviert wurde [159-161, 163, 196]. Erstaunlich wenig ist jedoch bislang über die grundlegenden Mechanismen der TL1A-vermittelten DR3 Aktivierung bekannt. Notwendigerweise muss bei der Erforschung dieses Systems berücksichtigt werden, dass sich DR3 Struktur und Expression im Gewebe sowie Expression der DR3 Isoformen zwischen murinem und humanem Organismus unterscheiden [197]. Deshalb ist die Charakterisierung der TL1A-DR3 Interaktion auf humanen Zellen bedeutungsvoll. Darüber hinaus simuliert die

Aktivierung von TNF Rezeptoren über agonistische Antikörper nicht unbedingt die Aktivierung, die über den physiologischen Liganden stattfindet. So können sich Antikörper-induzierte zelluläre Antwort und Ligand-induzierte Antwort fundamental unterscheiden, wie bereits für CD95 und Fn14 demonstriert wurde [198, 199]. Die Verwendung von agonistischen Antikörpern kann außerdem Fc-Rezeptor-abhängige Effekte hervorrufen. So kann beispielsweise antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität im Organismus auftreten. Dabei werden antikörperbeladene Zellen durch Effektorzellen des Immunsystems erkannt und zerstört. Es kann andererseits aufgrund der Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren auch zu einer verstärkten zellulären Signalantwort, also einem verstärkten Agonismus, kommen [14]. Es besteht zwar die Möglichkeit Antikörper ohne Fc-Rezeptorbindung zu generieren, allerdings büßen diese Varianten oftmals an Rezeptoraktivierungspotenzial ein, wie kürzlich für Fn14 und CD40 *in vivo* gezeigt wurde [200, 201]. TL1A-vermittelte DR3 Aktivierung könnte insofern eine vielversprechende Alternative zur Antikörper-vermittelten DR3 Aktivierung darstellen. Selbstverständlich muss jedoch zuerst der molekulare Mechanismus der DR3 Aktivierung durch TL1A untersucht werden, da sich die Liganden der TNF Familie der Kapazität zur Rezeptoraktivierung enorm unterscheiden.

Tatsächlich erwies sich, im Hinblick auf Zelltod-Induktion, TNF beträchtlich effektiver als TL1A. Die LD<sub>50</sub> für TNF betrug in TF-1 Zellen 0.54 ng/ml, wohingegen für TL1A eine LD<sub>50</sub> von 1740 ng/ml bestimmt wurde. Dieser enorme Unterschied erscheint überraschend, da DR3 und TNFR1 den bisherigen Erkenntnissen nach ähnliche intrazelluläre Signalwege aktivieren [127].

Interessanterweise werden sowohl für TNFR1- als auch DR3-Signaltransduktion cIAP1/2-TRAF2 Komplexe benötigt. Aktivierung von einigen TNF Rezeptoren, wie z.B. Fn14 oder TNFR2, haben die Degradation oder zytoplasmatische Depletion von cIAP1/2-TRAF2 Komplexen zur Folge. Diese Degradation/Depletion ermöglicht die Stabilisierung von NIK (*NFκB-inducing kinase*). NIK kann daraufhin über die Aktivierung des alternativen NFκB-Signalweges die Transkription verschiedenster Gene einleiten. Induziertes und sezerniertes TNF kann infolgedessen autokrin an TNFR1 auf der Zelloberfläche binden und aufgrund der Abwesenheit von cIAP1/2 Zelltod induzieren [168, 195, 202]. Eine mögliche DR3-induzierte Depletion von cIAP1/2-TRAF2 Komplexen mit nach nachfolgender TNF Sekretion konnte allerdings als Erklärung für die moderaten Effekte von TL1A ausgeschlossen werden. Die Anwesenheit des TNF-neutralisierenden Fusionsproteins Etanercept hatten keinen Effekt auf TL1A-behandelte TF-1 Zellen. Im Gegensatz dazu waren die Zellen in Anwesenheit von Etanercept vor Zelltod-Induktion durch exogenes TNF vollständig geschützt (Abbildung 4 B und C). Dies bedeutet, dass die pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Effekte von TL1A/DR3 direkt vermittelt und nicht von einem autokrinen Verstärkungsloop über TNF abhängig sind.

Der immense Unterschied zwischen TNF und TL1A bezüglich LD<sub>50</sub> (und auch IL-8 Sekretion (Abbildung 3 C)) könnte auch auf vermindertes Potential von löslichem TL1A zur Rezeptoraktivierung zurückzuführen sein. Ineffiziente Rezeptoraktivierung durch die lösliche Form des Liganden konnte bereits für CD95 [9] und auch andere TNF Rezeptoren demonstriert werden [14]. Eine Antikörper-vermittelte Quervernetzung von löslichen Liganden mimikriert die membranständige Form des Liganden. Diese sekundäre

Oligomerisierung ermöglicht experimentell das Aktivierungspotenzial der membranständigen Form nachzuahmen. Auf diese Weise konnte inaktives Flag-TRAIL zu einem hoch aktiven Liganden umfunktioniert werden, der sowohl robuste Zelltod-Induktion als auch NF $\kappa$ B-Aktivierung auszulösen vermochte (Abbildung 5 B und E). Es konnte demonstriert werden, das trimere TL1A in der Lage ist die Formation eines funktionellen Rezeptor-signalcomplexes (Abbildung 5 F) und apoptotischen Zelltod zu induzieren (Abbildung 5 A und 3 E) sowie NF $\kappa$ B zu aktivieren (Abbildung 5 C und D). Die sekundäre Oligomerisierung des Liganden oder eine hexamere Variante von TL1A erbrachte, weder im Hinblick auf NF $\kappa$ B Aktivierung (Abbildung 5 C und D) noch auf Apoptose-Induktion (Abbildung 5 A und H), eine signifikante Steigerung der zellulären Antwort. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass zur Aktivierung von DR3, ähnlich wie bei TNFR1, ein lösliches Trimer ausreichend ist.

Vorangegangene Studien demonstrierten Interferon- $\gamma$  Sekretion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit löslichem TL1A und in Co-Kultur Experimenten mit TL1A-exprimierenden Zellen [203, 204]. Außerdem wurde die Bindung von murinen und humanen, hexameren TL1A-Fc Fusionsproteinen an DR3 [205] und TL1A-Fc-induzierte Proliferation von murinen TH<sub>17</sub> Zellen beschrieben [123]. Allerdings wurde in keiner dieser Studien ein möglicher Unterschied zwischen löslichem und membrangebundenem bzw. trimeren und höher oligomerisiertem TL1A beleuchtet. Interessanterweise belegte der Vergleich eines hexameren TL1A-Ig Fusionskonstrukts mit dem agonistischen Antikörper ein höheres Potenzial von TL1A-Ig zur DR3-vermittelten Treg-Expansion [160]. Dies könnte auf unterschiedliche Effizienz der Rezeptoraktivierung durch Ligand und Antikörper zurückzuführen sein, jedoch wahrscheinlich nicht auf die hexamere Konformation des Liganden. Dieser Aspekt verdeutlicht erneut die Notwendigkeit die mechanistischen Aspekte der DR3 Aktivierung zu erforschen.

Die Bindung eines Liganden an seinen zugehörigen Rezeptor ist Voraussetzung um eine Signalantwort in einer Zelle einzuleiten. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor ist von der Affinität der beiden Proteine zueinander abhängig. Die Affinität von TL1A und DR3 ist bisher wenig untersucht. Die chemische Modifikation von TNF Liganden durch Iodierung oder Biotinylierung zur Bestimmung der Affinität unterliegt Limitationen. Beispielsweise können Variationen in der Markierungseffizienz oder eine Mischung von Molekülen mit inhomogener Aktivität auftreten. Durch die Verwendung des GpL-Flag-TNC-TL1A Konstrukts konnten diese Limitationen umgangen werden (Abbildung 6 A).

Mit Hilfe dieses Liganden konnte eine Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) an intakten Zellen durchgeführt werden. Dazu wurden HeLa-Zellen mit induzierbarer DR3 Expression verwendet. In diesen Zellen wurde ein DR3 Rezeptor exprimiert, dem durch Deletion die Todesdomäne entfernt wurde, da DR3 Überexpression zytotoxische Effekte mit sich bringen kann [130]. Die  $K_D$  der TL1A-DR3 Interaktion bei 37 °C betrug  $3777 \pm 2745$  pM. In einer vorangegangenen Studie wurde für die Bindung von TL1A an ein immobilisiertes DR3-Fc Konstrukt eine ähnliche  $K_D$  von  $6450 \pm 200$  pM gemessen [121]. Die  $K_D$  der TL1A-DR3 Interaktion wäre damit vergleichbar mit der  $K_D$  anderer Ligand-Rezeptor Paare der TNF Familie. So beträgt die  $K_D$  von CD95 Ligand und CD95 z.B. je nach Zelltyp zwischen 1100 und 3600 pM [169, 170]. Die  $K_D$  der TNF-TNFR1 Interaktion hingegen wurde als deutlich geringer beschrieben und liegt je nach Zelltyp zwischen 19 und 47 pM [169, 171]. Der deutlich niedrigere  $K_D$  Wert beschreibt somit eine höhere Affinität von TNF zu TNFR1

verglichen mit TL1A zu DR3. Dieser Unterschied bietet eine mögliche Erklärung für die Differenzen der zellulären Signalantworten nach TL1A oder TNF Stimulation in TF-1 Zellen an (Abbildung 3 C-E).

Zugegebenermaßen bestehen Zelltyp-spezifische Unterschiede bzgl. der Ligand-Rezeptor Affinität [171]. Daher wäre die Untersuchung der TL1A-DR3 Interaktion an weiteren Zelltypen/Zelllinien sicherlich sinnvoll. Interessanterweise wurde in einer neueren Arbeit eine deutlich niedrigere  $K_D$  von  $134 \pm 0.069$  pM für TL1A-DR3 mit dem gleichen GpL-Flag-TNC-TL1A Konstrukt bestimmt [169]. Allerdings wurde in dieser Studie ein volllänge DR3 Konstrukt inkl. Todesdomäne transient in HEK 293 Zellen exprimiert. Ob die Todesdomäne einen Einfluss auf die Bindung des Liganden hat, ist bislang nicht untersucht, wäre aber aufgrund der diskrepananten Datenlage durchaus vorstellbar.

Des Weiteren könnte auch der prozentuale Anteil an Rezeptoren, die mit einem Liganden interagieren müssen um eine zelluläre Antwort auszulösen, von Rezeptor zu Rezeptor innerhalb der TNF Familie divergieren. Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit, dass das Auftreten von membrangebundenen DR3 Spließvarianten die TL1A-induzierte Signalantwort beeinflussen könnte [119]. Ob DR3 Spließvarianten die Liganden-induzierte Signalantwort in Zellen verändern können, ist bislang ebenfalls noch nicht untersucht.

Im Hinblick auf diese Arbeit und auch auf alle weiteren Anwendungen von TL1A in Forschung und evtl. Therapie (z.B. Expansion regulatorischer T-Zellen) sind die Erkenntnisse zur Aktivierung von humanem DR3 von enormer Bedeutung. Durch diese Ergebnisse wird sichergestellt, dass durch Bindung von trimere TL1A die volle DR3 Aktivität erzielt wird und physiologisch gesehen wahrscheinlich kein Unterschied in der Rezeptoraktivierung zwischen löslichem und membranständigem Liganden existiert.

## 5.2 IAP Depletion ermöglicht Zelltod-Induktion durch TL1A/DR3

Die meisten bisherigen Studien untersuchten vor allem die nicht-apoptotischen Funktionen des TL1A/DR3 Systems *in vivo*. DR3 Signaltransduktion beinhaltet, ähnlich wie TNFR1 Signaltransduktion, die TRADD- und TRAF-abhängige Aktivierung von NF $\kappa$ B und Mitogenaktivierter Protein Kinasen [126]. Physiologische Bedeutung nicht-apoptotischer DR3 Signaltransduktion konnte sowohl für Zellen des Immunsystems wie T- und B-Lymphozyten aber auch für Zellen außerhalb des Immunsystems demonstriert werden [125]. In dieser Hinsicht spiegelt die kaum vorhandene Zytotoxizität von TL1A/DR3 in TF-1 und Ku812F Zellen (Abbildung 7 B-D, 8 A) die vorherrschende pro-inflammatorische Bedeutung des Ligand-Rezeptor Paares *in vivo* wider. Tatsächlich konnte durch die Gabe von neutralisierenden anti-TL1A Antikörpern in verschiedenen Mausmodellen ein milderer Verlauf inflammatorischer Erkrankungen erreicht werden [125], wodurch TL1A/DR3 auch als therapeutisches Angriffsziel für den Menschen attraktiv wurde.

Interessanterweise kann es durch Aktivierung von TNF Rezeptoren wie TNFR2 oder Fn14 zur Degradation von cIAP1/2-TRAF2 Komplexen (oder Depletion aus dem Zytoplasma)

kommen. Dies hat zur Folge, dass sich die TNFR1 Signalantwort in der Zelle um sprichwörtlich 180 Grad, von Überleben/Inflammation hin zu Apoptose, ändert [195, 202, 206]. Gleiches gilt für die IAP (*Inhibitor of apoptosis protein*) Degradation durch SMAC Mimetika. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellen durch die Degradation von IAPs mittels SMAC Mimetika auch gegenüber TL1A/DR3-induziertem Zelltod sensitiviert werden (Abbildung 7 C-E). DR3 wird nur von distinkten Zellpopulationen, oftmals nach Aktivierung, exprimiert. Daher könnte die Kombination von SMAC Mimetika und TL1A eine Möglichkeit darstellen, beispielsweise einen Entzündungsprozess durch selektives Abtöten der aktivierten Zellen abzuschalten. Aktuell durchlaufen bereits unterschiedliche SMAC Mimetika klinische Studien der Phase I und II und werden dabei als verträglich und durchaus vielversprechend beurteilt [175].

Bei TF-1 und Ku812F Zellen handelt es sich um Zelllinien, die ursprünglich einer Erythroleukämie und einer chronisch myeloischen Leukämie entstammen. Beide Leukämiezelllinien exprimieren endogen DR3 (Abbildung 3 B und 7 A), wodurch die Zelltod-Induktion durch TL1A und SMAC Mimetika Behandlung erst möglich wird. In einer neueren Studie wurde zudem DR3 Expression bei CLL (chronisch lymphatische Leukämie) Patienten auf isolierten CLL B-Zellen nachgewiesen [128]. In dieser Studie wurde zudem festgestellt, dass die Expression von DR3 vor allem bei Patienten im frühen Stadium (Rai Stadium 0) auftritt. TL1A inhibierte die Proliferation der entarteten B-Zellen ohne dabei zytotoxisch zu wirken. Diese Beobachtung deutet die Funktionalität des Rezeptors auf den isolierten B-Zellen an. Eventuell würde die Depletion von IAPs durch SMAC Mimetika einen zytotoxischen Effekt von TL1A in den CLL Zellen ermöglichen.

Eine Kombination von SMAC Mimetika mit TL1A oder anti-DR3 agonistischen Antikörpern könnte deshalb einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt für unterschiedliche Anwendungen darstellen.

### 5.3 DR3, ein neuer Nekroptose-induzierender Rezeptor der TNF Familie

Für lange Zeit wurde angenommen, dass Zelltod entweder geordnet bzw. apoptotisch oder aber zufällig und chaotisch bzw. nekrotisch abläuft. Die ungeordnete Natur von Nekrose gab wenig Hoffnung auf therapeutische Intervention gegen diese Art des Zellsterbens, obwohl bereits im 19. Jahrhundert erkannt wurde, dass Nekrose sowohl Konsequenz aber auch Auslöser von verschiedenen Krankheiten sein kann.

Allerdings wurde im letzten Jahrzehnt immer mehr deutlich, dass Apoptose nicht die einzige Form des geordneten Zelltodes darstellt, sondern auch nekrotischer Zelltod geregelt ablaufen kann. Unterschiedliche molekulare Mechanismen, über die Zellen geordneten bzw. programmierten Selbstmord begehen können, wurden entschlüsselt. Unter dem Begriff programmierte Nekrose werden heutzutage verschiedene nicht-apoptotische Zelltodprogramme wie Ferroptose, Nekroptose, Parthanatos, (N)Etose, MPT-Regulierte Nekrose (*Mitochondrial permeability transition mediated-regulated necrosis*) und Pyroptose



zusammengefasst [167]. Diese Zelltodprogramme involvieren unterschiedlichste molekulare Mechanismen, haben jedoch aufgrund ihrer lytischen Natur alle eine pro-inflammatorische Wirkung auf ihre Umgebung [207].

Nekroptose wird als RIP3- und MLKL-abhängiges Zelltodprogramm definiert und ist mit einer Vielzahl pathophysiologischer Prozesse wie z.B. Ischämie-Reperfusionsschaden (und akutem Nierenversagen), Krebs und chronischer Entzündung aber auch mit viralen und bakteriellen Infektionen assoziiert [208]. Die fundierten Kenntnisse über den molekularen Ablauf dieses Zelltodprogramms führten zur Entwicklung verschiedener Inhibitoren, durch die neue Optionen für therapeutische Intervention eröffnet werden. Bei vielen Erkrankungen, bei denen Nekroptose im pathologischen Prozess oder Erscheinungsbild involviert ist, bleibt jedoch unklar, was der auslösende Faktor der Zelltod-Induktion ist. *In vitro* Studien heben bislang vor allem TNFR1 als Nekroptose Induktor hervor. Nichtsdestotrotz protektiert beispielsweise TNFR1 Defizienz Mäuse in einem renalen Ischämie-Reperfusions-Modell nicht [209], was die Beteiligung eines anderen (Todes-) Rezeptors und/oder Signals zur Zelltod-Induktion nahe legt. Neben TNFR1 wurden bereits die TNF-Familienmitglieder TRAILR1/2 und CD95 als Initiatoren für Nekroptose beschrieben [75].

In dieser Arbeit konnte DR3 als neuer Nekroptose-induzierender Rezeptor identifiziert werden. TL1A/DR3- und TNF/TNFR1-vermittelter nekroptotischer Zelltod weisen einige Parallelen auf. In beiden Fällen muss Caspase-Aktivität blockiert sein und eine cIAP1/2 Depletion oder TAK1-, und damit auch IKK $\alpha/\beta$ , Inhibition vorliegen (Abbildung 8 und 7). Beide Rezeptoren induzieren die Formation eines Nekrosoms, bestehend aus RIP1 und RIP3, sowie Aktivierung des Effektormoleküls MLKL (Abbildung 9). Außerdem muss sowohl für TNFR1- als auch DR3-induzierte Nekroptose die Stabilität der RIP-Kinasen und MLKL durch HSP90 gewährleistet sein (Abbildung 10). TL1A initiiert, genauso wie TNF, ROS Produktion als Begleiterscheinung von Nekroptose (Abbildung 12). Begleiterscheinung deshalb, weil die Vorbehandlung der nekroptotischen Zellen mit dem Antioxidans Butylhydroxyanisol DR3-induzierte Nekroptose nicht beeinflusste. Die Rolle von ROS für nekroptotischen Zelltod wird in der Literatur kontrovers diskutiert [210]. In einigen murinen Zelllinien wie L929 oder RAW 264.7 [57, 211], aber auch in humanen Leukämie-Zellen [185] ist die mitochondriale ROS Produktion essentiell für den Ablauf TNF-induzierter Nekroptose. In anderen zellulären Systemen scheint der Ablauf von Nekroptose komplett unabhängig von ROS zu sein. Beispielsweise ist nekroptotischer Zelltod in SVEC und 3T3 Zellen, in denen aufgrund einer Depletion der Mitochondrien keine ROS Produktion mehr stattfindet, unbeeinflusst [186]. Die Daten zu TL1A/DR3-induzierter ROS Produktion in Ku812F Zellen ähneln denen, die von Temkin *et al.* für monozytäre THP1 Zellen beschrieben wurden. In THP1 Zellen steigen zwar nach TNF-induzierter Nekrose zelluläre ROS Level an, allerdings verhindern verschiedene Antioxidantien wie Ascorbinsäure und N-Acetylcystein den herbeigeführten Zelltod nicht [212]. Eine bedeutungsvolle Rolle für ROS bei DR3-initiiertter Nekroptose in Ku812F Zellen kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden, zugegebenermaßen könnten demgegenüber in anderen Zellsystemen/Zelltypen eventuell andere Befunde hinsichtlich der Relevanz von ROS generiert werden.

Trotz mechanistischer Ähnlichkeiten bei DR3- und TNFR1-initiiertter Nekroptose und struktureller Verwandtschaft der beiden Rezeptoren ist die unterschiedliche Expressionsverteilung der beiden Rezeptoren höchst interessant. Während TNFR1 fast ubiquitär

exprimiert wird, wurde DR3 Expression bisher vor allem auf aktivierten T-Zellen und ILCs entdeckt [125]. Jedoch konnte DR3 auch auf menschlichen Nierenzellen gefunden werden. Im Vergleich zu gesunden Nierenbiopsien wurde in abgestoßenem Nierengewebe nach allogener Nierentransplantation gesteigerte DR3 Expression auf vaskulären Endothelzellen und tubulären Epithelzellen detektiert [213]. Die Präsenz von DR3 in abgestoßenen (ischämischen) Transplantaten, die akute Nekrose der Tubuluszellen aufwiesen, identifiziert DR3 als möglichen Mediator von Entzündung und Zelltod. Der Ligand von DR3, TL1A konnte adäquat dazu auf mRNA und Proteinebene, ebenfalls in abgestoßenem humanen Nierengewebe detektiert werden [129]. Ischämie-Reperfusionsschaden ist einer der Hauptgründe für akutes Nierenversagen, sowohl bei nativen als auch bei transplantierten Nieren. Interessanterweise spielt RIP1-abhängige Nekroptose im Modell für renalen Ischämie-Reperfusionsschaden eine gravierende Rolle [112]. Nekroptose wird in diesem Modell, wie bereits erwähnt, unabhängig von TNFR1 eingeleitet [209]. Die Beteiligung von CD95 als Auslöser für nekroptotischen Zelltod in diesem Modell wurde bereits untersucht [214]. Dabei hatte die Inhibition des CD95L/CD95 Ligand-Rezeptor-Systems über genetische als auch pharmakologische Ansätze zwar eine gewisse Verbesserung, allerdings keine vollständige Aufhebung des Krankheitsbildes zur Folge. Ob DR3-induzierte Nekroptose in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt ist bislang nicht untersucht. Die Untersuchung DR3-defizienter Mäuse in diesem Modell könnte ein vielversprechender Ansatz sein um: a) zu klären ob DR3 als Auslöser für nekroptotischen Zelltod in der Niere agiert und b) evtl. Blockade von TL1A oder DR3 eine therapeutische Interventionsmöglichkeit zur Verhinderung von renalem Ischämie-Reperfusionsschaden und akutem Nierenversagen sein könnte.

Entzündliche Prozesse im Organismus involvieren üblicherweise verschiedene Liganden der TNF Familie wie z.B. TWEAK, TL1A oder TNF selbst. Ferner exprimieren die meisten Zelltypen mehrere TNF Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Da die meisten TNF Rezeptoren den gleichen zytoplasmatischen Pool an Adaptermolekülen zur Signaltransduktion nutzen, kann es bei simultaner oder sequentieller Aktivierung mehrere Rezeptoren zu Engpässen bei der Verfügbarkeit dieser Adaptermoleküle kommen. Dadurch kann sich die zelluläre Antwort fundamental ändern. Beispielsweise depletiert TNFR2 Aktivität TRAF2-cIAP Komplexe aus dem zytoplasmatischen Pool, was ein Umschalten einer darauffolgenden TNFR1 Signalantwort von Entzündung hinzu Apoptose zur Folge hat [206]. Das ist in besonderem Maße interessant, da TRAF2-cIAP Komplexe bedeutsame zelluläre Nekroptose Inhibitoren sind [215]. Zudem depletiert auch TWEAK-Fn14 Interaktion, ähnlich wie SMAC Mimetika, TRAF2-cIAP Komplexe und verstärkt dadurch CD95L- und TRAIL-induzierte Nekroptose [216]. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es durchaus vorstellbar, dass DR3-induzierte Nekroptose nicht nur unter Caspase-Inhibition und SMAC Mimetika Behandlung *in vitro*, sondern auch in einer komplexen Entzündungssituation *in vivo* stattfindet.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit DR3 als Induktor für nekroptotischen Zelltod identifiziert werden. Diese Erkenntnis erweitert das bisherige Verständnis der TL1A/DR3 Signaltransduktion und fügt der Gruppe von Nekroptose-Auslösern mit DR3 einen neuen Spieler bei. In Zukunft sollte aufgrund dieses Befundes eine mögliche Beteiligung des TL1A/DR3-Systems bei Krankheitsbildern mit assoziiertem nekroptotischem Zellsterben ins Kalkül gezogen und untersucht werden.

## 5.4 DR3 Expression auf humanen regulatorischen T-Zellen

Konventionelle CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch Tregs werden von Familienmitgliedern der TNF-Familie reguliert [217]. TL1A/DR3 wurde als T-Zell Co-Stimulator identifiziert [121] und eine Beteiligung dieses Ligand-Rezeptor Paares an unterschiedlichen entzündlichen (Autoimmun-) Erkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis, Psoriasis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, demonstriert (Übersicht bei Richard *et al.* [125]). TL1A-neutralisierende Antikörper werden daher als vielversprechende therapeutische Agenzien gesehen und entwickelt. In Zukunft sollen diese als komplementäres Agens zu TNF Blockern v.a. bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden.

Es konnte jedoch in einer Reihe eleganter Studien auch eine anti-inflammatorische Funktion von DR3 *in vivo* nachgewiesen werden. DR3-vermittelte Expansion von Tregs in der Maus hatte vorteilhafte Auswirkungen im Modell der Allergie-bedingten Lungenentzündung, bei GVHD und bei Organtransplantation [159-162].

Für derartige Erkrankungen bzw. Anwendungen, bei denen eine anti-inflammatorische Wirkung zur Eindämmung von Autoimmunität wünschenswert ist, werden derzeit Treg-basierte Therapien im Menschen entwickelt und getestet [155]. Daher ist der erstmalige Nachweis von DR3 als funktioneller Rezeptor auf humanen Tregs (Abbildung 13 und 15), der Treg-Proliferation steigern kann (Abbildung 15 B und C) von großer Bedeutung und eröffnet neuen Perspektiven im Hinblick auf Treg-basierte Therapiestrategien. Gleichzeitig zeigen diese Daten, dass der trimere Ligand auch auf primären Zellen zur Aktivierung DR3-vermittelter Signalwege fähig ist. Voraussetzung für eine mögliche therapeutische Anwendung ist die Aufrechterhaltung der suppressiven Kapazität der Tregs nach DR3 Stimulation. Diese war nach zweiwöchiger Expansion der Zellen, isoliert von drei unterschiedlichen Spendern, unter TL1A nicht negativ beeinflusst (Abbildung 15 F). Die Daten sind dahingehend mit den *in vivo* Befunden konform, da in den oben zitierten Modellen Tregs nach DR3-vermittelter Expansion ebenfalls ihre Funktionalität bzw. Suppressivität beibehalten hatten.

Übereinstimmend sind die Beobachtungen auch in Bezug auf die Notwendigkeit von IL-2 und T-Zell Rezeptor Stimulation. *In vivo* konnte keine DR3-vermittelte Treg Expansion in IL2-Rezeptor- oder MHCII-defizienten Mäuse durch Injektion des agonistischen Antikörpers erzielt werden [159]. In *ex vivo* Proliferationsexperimenten konnte in Abwesenheit von T-Zell Rezeptorstimulation oder IL-2 keine Proliferation von humanen Tregs nach TL1A Stimulation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Abhängigkeit von T-Zellrezeptor Signalen bietet, neben der exklusiven Expression von DR3 auf Tregs, eine zusätzliche mögliche Erklärung für die selektive Expansion von Tregs nach DR3 Stimulation. Selbstantigene, welche von T-Zellrezeptoren auf Tregs erkannt werden, sind im Gegensatz zu Fremdanitigenen ständig verfügbar. Daher könnte die Verfügbarkeit von Autoantigenen und damit einhergehende tonische T-Zellrezeptor Stimulation dazu beitragen, dass Behandlung von gesunden Labormäusen mit anti-DR3 Agonisten zur selektiven Aktivierung der Treg-Zellpopulation führt.

Des Weiteren ist die Expansion von murinen Tregs *in vivo* [161] als auch von humanen Tregs *in vitro* über DR3 unter Rapamycin möglich und damit höchstwahrscheinlich unabhängig von mTORC1 (Abbildung 15 B und C). Diese Erkenntnis ist insofern interessant, als dass

Rapamycin als Immunsuppressivum beispielsweise zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen bereits klinisch eingesetzt wird. Insofern wäre eine Kombinationstherapie von Rapamycin und TL1A oder DR3-Agonisten, z.B. als Prophylaxe bei Transplantationen, durchaus vorstellbar.

Etwas diskrepant sind hingegen die Befunde bzgl. *ex vivo* Proliferation von murinen und humanen Tregs. In einer Studie wurde berichtet, dass isolierte murine Tregs *in vitro* unter verschiedensten Bedingungen bzw. unterschiedlichen Kombinationen aus anti-DR3-Antikörper, anti-CD3/antiCD28 Beads, TGF- $\beta$  und IL-2 nicht zu Proliferation angeregt werden konnten [159]. In einer anderen Studie wurde jedoch demonstriert, dass DR3-induzierte Proliferation von murinen Tregs auch *in vitro* möglich ist [160]. Ein Vergleich der Treg-Proliferationsrate, induziert durch ein hexameres TL1A-Ig Konstrukt oder den agonistischen Antikörper, fiel in dieser Studie zugunsten des Liganden aus. Diese Beobachtungen könnten als Überlegenheit des Liganden TL1A gegenüber dem agonistischen Antikörper bzgl. der Rezeptoraktivierung interpretiert werden.

Generell muss bei Antikörper-vermittelter Aktivierung von TNF Rezeptoren die Fc-Rezeptorbindung berücksichtigt werden. Dabei kann diese positive oder aber negative Effekte zur Konsequenz haben. Einerseits kann zusätzliche Fc-Rezeptorbindung zu einer erheblichen synergistischen Steigerung der zellulären Antwort führen, dabei jedoch auch komplett unterschiedliche intrazelluläre Signalwege anschalten [198, 199]. Andererseits kann, wie bereits erwähnt, die Fc-Rezeptoraktivierung auch zu antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität führen. Daher wurde in dieser Arbeit eine Ligand-basierte Strategie zur DR3 Aktivierung gewählt und die biologische Aktivität des verwendeten trimeren Liganden sichergestellt.

Moleküle der TNF Familie auf Tregs als Angriffspunkt für therapeutische Intervention zu nutzen, beschränkt sich nicht nur auf Aktivierung oder Steigerung der inhibitorischen Effekte dieser Zellpopulation. Die Blockade von Liganden oder Rezeptoren der TNF Familie kann Tregs auch ihrer Funktionalität berauben. Dies ist vor allem dann nützlich, wenn beispielsweise die Effektivität einer Immuntherapie bei Krebs negativ von Tregs beeinflusst wird, da Tregs in Tumoren unterschiedlicher Krebsentitäten anzutreffen sind [218].

In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Blockade von TNFR2, einem charakteristischem Marker hochsuppressiver Tregs, mittels antagonistischen Antikörpern die Proliferation von Tregs der Tumorumgebung inhibierte [219]. Die Proliferation von Effektor T-Zellen blieb hingegen unbeeinflusst.

Ob die Blockade von DR3 und den nachfolgenden Signalwegen humane Tregs funktionell beeinflusst ist bislang noch nicht untersucht worden. Dieser Ansatz könnte außerdem Aufschluss geben, ob DR3-vermittelte Signale für Treg-Proliferation und/oder Funktionalität essentiell sind, oder aber durch andere TNF Rezeptoren wie 4-1BB, OX40, GITR oder CD27, die ebenfalls auf Tregs exprimiert werden, kompensiert werden können.

Es muss trotz allem bedacht werden, dass sich die Expression von TNF Rezeptoren *in vivo* unterscheiden kann, was die Verwendung von TNF Ligand-Rezeptor Systemen im Hinblick auf therapeutische Anwendungen zusätzlich erschweren und verkomplizieren kann. Demzufolge ist der Nachweis der Expression von TNF-Familienmitgliedern auf/in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben, sowie die Aufklärung grundlegender Mechanismen und Eigenschaften der TNF Biologie von entscheidender Bedeutung.

Der Nachweis von DR3 als funktioneller Rezeptor auf humanen Tregs und dessen Aktivierbarkeit durch den löslichen Liganden TL1A erweitert das komplexe Netzwerk der menschlichen Treg Regulation um einen weiteren Akteur.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
2. Ware, C.F., *The TNF superfamily*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 181-4.
3. Aggarwal, B.B., et al., *Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization*. J Biol Chem, 1985. **260**(4): p. 2345-54.
4. Aggarwal, B.B., B. Moffat, and R.N. Harkins, *Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization*. J Biol Chem, 1984. **259**(1): p. 686-91.
5. Grell, M., et al., *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1995. **83**(5): p. 793-802.
6. Grell, M., et al., *The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 570-5.
7. Muller, N., et al., *Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization*. FEBS J, 2008. **275**(9): p. 2296-304.
8. Wyzgol, A., et al., *Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 1851-61.
9. Schneider, P., et al., *Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1205-13.
10. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
11. Smith, C.A., T. Farrah, and R.G. Goodwin, *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. Cell, 1994. **76**(6): p. 959-62.
12. Chan, F.K., *The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function*. Ann Rheum Dis, 2000. **59 Suppl 1**: p. i50-3.
13. Chan, F.K., *Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling*. Cytokine, 2007. **37**(2): p. 101-7.

14. Wajant, H., *Principles of antibody-mediated TNF receptor activation*. Cell Death Differ, 2015. **22**(11): p. 1727-41.
15. Emery, J.G., et al., *Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14363-7.
16. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
17. Aderka, D., *The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 1996. **7**(3): p. 231-40.
18. Garton, K.J., P.J. Gough, and E.W. Raines, *Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1105-16.
19. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Non-apoptotic Fas signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(1): p. 53-66.
20. Walczak, H., *Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(5): p. a008698.
21. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 1995. **81**(4): p. 495-504.
22. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor 1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.
23. Harper, N., et al., *Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25534-41.
24. Hsu, H., et al., *TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 387-96.
25. Schneider-Brachert, W., et al., *Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles*. Immunity, 2004. **21**(3): p. 415-28.
26. Legler, D.F., et al., *Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation*. Immunity, 2003. **18**(5): p. 655-64.
27. Dynek, J.N., et al., *c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling*. EMBO J, 2010. **29**(24): p. 4198-209.
28. Gerlach, B., et al., *Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 591-6.

29. Varfolomeev, E., et al., *c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24295-9.
30. Park, S.M., J.B. Yoon, and T.H. Lee, *Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro*. FEBS Lett, 2004. **566**(1-3): p. 151-6.
31. Tokunaga, F., et al., *Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 123-32.
32. Draber, P., et al., *LUBAC-Recruited CYLD and A20 Regulate Gene Activation and Cell Death by Exerting Opposing Effects on Linear Ubiquitin in Signaling Complexes*. Cell Rep, 2015. **13**(10): p. 2258-72.
33. Haas, T.L., et al., *Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction*. Mol Cell, 2009. **36**(5): p. 831-44.
34. Kanayama, A., et al., *TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 535-48.
35. Ea, C.K., et al., *Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO*. Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 245-57.
36. Wu, C.J., et al., *Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(4): p. 398-406.
37. Rahighi, S., et al., *Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation*. Cell, 2009. **136**(6): p. 1098-109.
38. Wang, C., et al., *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
39. Shim, J.H., et al., *TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo*. Genes Dev, 2005. **19**(22): p. 2668-81.
40. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines*. Semin Immunol, 2014. **26**(3): p. 253-66.
41. Kovalenko, A., et al., *The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 801-5.
42. Trompouki, E., et al., *CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 793-6.
43. Ting, A.T. and M.J. Bertrand, *More to Life than NF-kappaB in TNFR1 Signaling*. Trends Immunol, 2016. **37**(8): p. 535-45.



- 
44. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221-7.
  45. Micheau, O., et al., *NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5299-305.
  46. Muzio, M., et al., *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex*. Cell, 1996. **85**(6): p. 817-27.
  47. Dondelinger, Y., et al., *RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition*. Cell Death Differ, 2013. **20**(10): p. 1381-92.
  48. Dondelinger, Y., et al., *NF-kappaB-Independent Role of IKKalpha/IKKbeta in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling*. Mol Cell, 2015. **60**(1): p. 63-76.
  49. Wang, L., F. Du, and X. Wang, *TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways*. Cell, 2008. **133**(4): p. 693-703.
  50. Chang, L., et al., *The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover*. Cell, 2006. **124**(3): p. 601-13.
  51. O'Donnell, M.A., et al., *Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling*. Curr Biol, 2007. **17**(5): p. 418-24.
  52. Bertrand, M.J., et al., *cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination*. Mol Cell, 2008. **30**(6): p. 689-700.
  53. Moulin, M., et al., *IAPs limit activation of RIP kinases by TNF receptor 1 during development*. EMBO J, 2012. **31**(7): p. 1679-91.
  54. Peltzer, N., et al., *HOIP deficiency causes embryonic lethality by aberrant TNFR1-mediated endothelial cell death*. Cell Rep, 2014. **9**(1): p. 153-65.
  55. Rickard, J.A., et al., *TNFR1-dependent cell death drives inflammation in Sharpin-deficient mice*. Elife, 2014. **3**.
  56. Legarda-Addison, D., et al., *NEMO/IKKgamma regulates an early NF-kappaB-independent cell-death checkpoint during TNF signaling*. Cell Death Differ, 2009. **16**(9): p. 1279-88.
  57. Vanlangenakker, N., et al., *cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production*. Cell Death Differ, 2011. **18**(4): p. 656-65.

- 
58. Steller, H., *Mechanisms and genes of cellular suicide*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1445-9.
  59. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
  60. Wilson, N.S., V. Dixit, and A. Ashkenazi, *Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks*. Nat Immunol, 2009. **10**(4): p. 348-55.
  61. Peter, M.E. and P.H. Krammer, *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 26-35.
  62. Salvesen, G.S. and V.M. Dixit, *Caspase activation: the induced-proximity model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 10964-7.
  63. Boatright, K.M., et al., *A unified model for apical caspase activation*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 529-41.
  64. Krueger, A., et al., *Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20633-40.
  65. Meng, X.W., et al., *High cell surface death receptor expression determines type I versus type II signaling*. J Biol Chem, 2011. **286**(41): p. 35823-33.
  66. Kurita, S., et al., *Hedgehog inhibition promotes a switch from Type II to Type I cell death receptor signaling in cancer cells*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18330.
  67. Jost, P.J., et al., *XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis*. Nature, 2009. **460**(7258): p. 1035-9.
  68. Barnhart, B.C., E.C. Alappat, and M.E. Peter, *The CD95 type I/type II model*. Semin Immunol, 2003. **15**(3): p. 185-93.
  69. Vaux, D.L. and J. Silke, *Mammalian mitochondrial IAP binding proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 499-504.
  70. Vande Walle, L., M. Lamkanfi, and P. Vandenabeele, *The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 453-60.
  71. Kelley, S.K. and A. Ashkenazi, *Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 333-9.
  72. Parrish, A.B., C.D. Freel, and S. Kornbluth, *Cellular mechanisms controlling caspase activation and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(6).
  73. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.

- 
74. Chan, F.K., et al., *A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51613-21.
  75. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 489-95.
  76. Laster, S.M., J.G. Wood, and L.R. Gooding, *Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis*. J Immunol, 1988. **141**(8): p. 2629-34.
  77. Kim, S.J. and J. Li, *Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e716.
  78. Seya, T., et al., *TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis*. Oncoimmunology, 2012. **1**(6): p. 917-923.
  79. Thapa, R.J., et al., *Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(33): p. E3109-18.
  80. Upton, J.W., W.J. Kaiser, and E.S. Mocarski, *DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA*. Cell Host Microbe, 2012. **11**(3): p. 290-7.
  81. Kuriakose, T., et al., *ZBP1/DAI is an innate sensor of influenza virus triggering the NLRP3 inflammasome and programmed cell death pathways*. Sci Immunol, 2016. **1**(2).
  82. Thapa, R.J., et al., *DAI Senses Influenza A Virus Genomic RNA and Activates RIPK3-Dependent Cell Death*. Cell Host Microbe, 2016. **20**(5): p. 674-681.
  83. Oberst, A., et al., *Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis*. Nature, 2011. **471**(7338): p. 363-7.
  84. Pop, C., et al., *FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity*. Biochem J, 2011. **433**(3): p. 447-57.
  85. O'Donnell, M.A., et al., *Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(12): p. 1437-42.
  86. Zhang, D.W., et al., *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. Science, 2009. **325**(5938): p. 332-6.

- 
87. Cho, Y.S., et al., *Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1112-23.
  88. He, S., et al., *Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1100-11.
  89. Feoktistova, M., et al., *cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms*. Mol Cell, 2011. **43**(3): p. 449-63.
  90. Li, J., et al., *The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis*. Cell, 2012. **150**(2): p. 339-50.
  91. Degterev, A., et al., *Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(5): p. 313-21.
  92. Kaiser, W.J., et al., *Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL*. J Biol Chem, 2013. **288**(43): p. 31268-79.
  93. Rebsamen, M., et al., *DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB*. EMBO Rep, 2009. **10**(8): p. 916-22.
  94. Sun, L., et al., *Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase*. Cell, 2012. **148**(1-2): p. 213-27.
  95. McQuade, T., Y. Cho, and F.K. Chan, *Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis*. Biochem J, 2013. **456**(3): p. 409-15.
  96. Chen, W., et al., *Diverse sequence determinants control human and mouse receptor interacting protein 3 (RIP3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) interaction in necroptotic signaling*. J Biol Chem, 2013. **288**(23): p. 16247-61.
  97. Zhao, J., et al., *Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(14): p. 5322-7.
  98. Wang, H., et al., *Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3*. Mol Cell, 2014. **54**(1): p. 133-46.
  99. Dondelinger, Y., et al., *MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates*. Cell Rep, 2014. **7**(4): p. 971-81.
  100. Cai, Z., et al., *Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(1): p. 55-65.

101. Chen, X., et al., *Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death*. Cell Res, 2014. **24**(1): p. 105-21.
102. Wu, J., et al., *Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis*. Cell Res, 2013. **23**(8): p. 994-1006.
103. Newton, K., X. Sun, and V.M. Dixit, *Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(4): p. 1464-9.
104. Benedict, C.A., P.S. Norris, and C.F. Ware, *To kill or be killed: viral evasion of apoptosis*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1013-8.
105. Vanden Berghe, T., B. Hassannia, and P. Vandenabeele, *An outline of necrosome triggers*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(11-12): p. 2137-52.
106. Nogusa, S., et al., *RIPK3 Activates Parallel Pathways of MLKL-Driven Necroptosis and FADD-Mediated Apoptosis to Protect against Influenza A Virus*. Cell Host Microbe, 2016. **20**(1): p. 13-24.
107. Guo, H., W.J. Kaiser, and E.S. Mocarski, *Manipulation of apoptosis and necroptosis signaling by herpesviruses*. Med Microbiol Immunol, 2015. **204**(3): p. 439-48.
108. Luo, J., et al., *Hijacking of death receptor signaling by bacterial pathogen effectors*. Apoptosis, 2015. **20**(2): p. 216-23.
109. Pearson, J.S., et al., *EspL is a bacterial cysteine protease effector that cleaves RHIM proteins to block necroptosis and inflammation*. Nat Microbiol, 2017. **2**: p. 16258.
110. Smith, C.C., et al., *Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent?* Cardiovasc Drugs Ther, 2007. **21**(4): p. 227-33.
111. Lin, J., et al., *A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development*. Cell Rep, 2013. **3**(1): p. 200-10.
112. Linkermann, A., et al., *Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury*. Kidney Int, 2012. **81**(8): p. 751-61.
113. Oerlemans, M.I., et al., *Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo*. Basic Res Cardiol, 2012. **107**(4): p. 270.
114. Gunther, C., et al., *Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis*. Nature, 2011. **477**(7364): p. 335-9.
115. Welz, P.S., et al., *FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation*. Nature, 2011. **477**(7364): p. 330-4.

116. Mandal, P., et al., *RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity*. Mol Cell, 2014. **56**(4): p. 481-95.
117. Schreiber, T.H. and E.R. Podack, *Immunobiology of TNFSF15 and TNFRSF25*. Immunol Res, 2013. **57**(1-3): p. 3-11.
118. Schreiber, T.H., D. Wolf, and E.R. Podack, *The role of TNFRSF25:TNFSF15 in disease... and health?* Adv Exp Med Biol, 2011. **691**: p. 289-98.
119. Screaton, G.R., et al., *LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4615-9.
120. Warzocha, K., et al., *A new death receptor 3 isoform: expression in human lymphoid cell lines and non-Hodgkin's lymphomas*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **242**(2): p. 376-9.
121. Migone, T.S., et al., *TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator*. Immunity, 2002. **16**(3): p. 479-92.
122. Twohig, J.P., et al., *The death receptor 3/TL1A pathway is essential for efficient development of antiviral CD4(+) and CD8(+) T-cell immunity*. FASEB J, 2012. **26**(8): p. 3575-86.
123. Pappu, B.P., et al., *TL1A-DR3 interaction regulates Th17 cell function and Th17-mediated autoimmune disease*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1049-62.
124. Richard, A.C., et al., *The TNF-family ligand TL1A and its receptor DR3 promote T cell-mediated allergic immunopathology by enhancing differentiation and pathogenicity of IL-9-producing T cells*. J Immunol, 2015. **194**(8): p. 3567-82.
125. Richard, A.C., et al., *The TNF-family cytokine TL1A: from lymphocyte costimulator to disease co-conspirator*. J Leukoc Biol, 2015. **98**(3): p. 333-45.
126. Wen, L., et al., *TL1A-induced NF-kappaB activation and c-IAP2 production prevent DR3-mediated apoptosis in TF-1 cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 39251-8.
127. Varfolomeev, E., et al., *Cellular inhibitors of apoptosis are global regulators of NF-kappaB and MAPK activation by members of the TNF family of receptors*. Sci Signal, 2012. **5**(216): p. ra22.
128. Cavallini, C., et al., *Expression and function of the TL1A/DR3 axis in chronic lymphocytic leukemia*. Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 32061-74.
129. Al-Lamki, R.S., et al., *TL1A both promotes and protects from renal inflammation and injury*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(5): p. 953-60.

130. Chinnaiyan, A.M., et al., *Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95*. Science, 1996. **274**(5289): p. 990-2.
131. Prehn, J.L., et al., *The T cell costimulator TL1A is induced by FcγR signaling in human monocytes and dendritic cells*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4033-8.
132. Meylan, F., et al., *The TNF-family receptor DR3 is essential for diverse T cell-mediated inflammatory diseases*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 79-89.
133. Zhang, J., et al., *Role of TL1A in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2009. **183**(8): p. 5350-7.
134. Wang, E.C., et al., *Regulation of early cartilage destruction in inflammatory arthritis by death receptor 3*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(10): p. 2762-72.
135. Bull, M.J., et al., *The Death Receptor 3-TNF-like protein 1A pathway drives adverse bone pathology in inflammatory arthritis*. J Exp Med, 2008. **205**(11): p. 2457-64.
136. Bamias, G., et al., *Role of TL1A and its receptor DR3 in two models of chronic murine ileitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8441-6.
137. Bamias, G., et al., *Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4868-74.
138. Takedatsu, H., et al., *TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T-helper 1 and T-helper 17 activation*. Gastroenterology, 2008. **135**(2): p. 552-67.
139. Buchan, S.L., et al., *Death receptor 3 is essential for generating optimal protective CD4(+) T-cell immunity against Salmonella*. Eur J Immunol, 2012. **42**(3): p. 580-8.
140. Yu, X., et al., *TNF superfamily member TL1A elicits type 2 innate lymphoid cells at mucosal barriers*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(3): p. 730-40.
141. Kitson, J., et al., *A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis*. Nature, 1996. **384**(6607): p. 372-5.
142. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
143. Ng, W.F., et al., *Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2736-44.
144. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.

145. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
146. Yagi, H., et al., *Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells*. Int Immunol, 2004. **16**(11): p. 1643-56.
147. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
148. Chen, X. and J.J. Oppenheim, *Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(10): p. 1489-96.
149. Schmetterer, K.G., A. Neunkirchner, and W.F. Pickl, *Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation*. FASEB J, 2012. **26**(6): p. 2253-76.
150. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 183-90.
151. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
152. Oberle, N., et al., *Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3578-87.
153. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
154. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
155. Bluestone, J.A., E. Trotta, and D. Xu, *The therapeutic potential of regulatory T cells for the treatment of autoimmune disease*. Expert Opin Ther Targets, 2015. **19**(8): p. 1091-103.
156. Morikawa, H. and S. Sakaguchi, *Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells*. Immunol Rev, 2014. **259**(1): p. 192-205.
157. Chopra, M., et al., *Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion*. J Exp Med, 2016. **213**(9): p. 1881-900.
158. Okubo, Y., et al., *Homogeneous expansion of human T-regulatory cells via tumor necrosis factor receptor 2*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 3153.
159. Schreiber, T.H., et al., *Therapeutic Treg expansion in mice by TNFRSF25 prevents allergic lung inflammation*. J Clin Invest, 2010. **120**(10): p. 3629-40.



160. Khan, S.Q., et al., *Cloning, expression, and functional characterization of TL1A-Ig*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1540-50.
161. Wolf, D., et al., *Tregs expanded in vivo by TNFRSF25 agonists promote cardiac allograft survival*. Transplantation, 2012. **94**(6): p. 569-74.
162. Kim, B.S., et al., *Treatment with agonistic DR3 antibody results in expansion of donor Tregs and reduced graft-versus-host disease*. Blood, 2015. **126**(4): p. 546-57.
163. Nishikii, H., et al., *DR3 signaling modulates the function of Foxp3+ regulatory T cells and the severity of acute graft-versus-host disease*. Blood, 2016. **128**(24): p. 2846-2858.
164. McMurchy, A.N. and M.K. Levings, *Suppression assays with human T regulatory cells: a technical guide*. Eur J Immunol, 2012. **42**(1): p. 27-34.
165. Berg, D., et al., *Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L*. Cell Death Differ, 2007. **14**(12): p. 2021-34.
166. Loetscher, H., et al., *Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26350-7.
167. Vanden Berghe, T., et al., *Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling*. Mol Cell Oncol, 2015. **2**(4): p. e975093.
168. Vince, J.E., et al., *TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha*. J Cell Biol, 2008. **182**(1): p. 171-84.
169. Lang, I., et al., *Binding Studies of TNF Receptor Superfamily (TNFRSF) Receptors on Intact Cells*. J Biol Chem, 2016. **291**(10): p. 5022-37.
170. Lang, I., et al., *Signaling active CD95 receptor molecules trigger co-translocation of inactive CD95 molecules into lipid rafts*. J Biol Chem, 2012. **287**(28): p. 24026-42.
171. Fick, A., et al., *Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14)*. J Biol Chem, 2012. **287**(1): p. 484-95.
172. Bittner, S., et al., *Soluble TL1A is sufficient for activation of death receptor 3*. FEBS J, 2016. **283**(2): p. 323-36.
173. Varfolomeev, E., et al., *IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis*. Cell, 2007. **131**(4): p. 669-81.

- 
174. de Almagro, M.C. and D. Vucic, *The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy*. Exp Oncol, 2012. **34**(3): p. 200-11.
175. Fulda, S., *Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(22): p. 5030-6.
176. Wu, Y.T., et al., *zVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNFalpha mediated by the PKC-MAPKs-AP-1 pathway*. Cell Death Differ, 2011. **18**(1): p. 26-37.
177. Feng, S., et al., *Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain*. Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2056-67.
178. Yoon, S., et al., *Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it*. Cell Death Differ, 2016. **23**(2): p. 253-60.
179. Li, D., et al., *A cytosolic heat shock protein 90 and cochaperone CDC37 complex is required for RIP3 activation during necroptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(16): p. 5017-22.
180. Vanden Berghe, T., et al., *Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5622-9.
181. Fearn, C., et al., *Triad3A regulates ubiquitination and proteasomal degradation of RIP1 following disruption of Hsp90 binding*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34592-600.
182. Lewis, J., et al., *Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10519-26.
183. Ehrenschrwender, M., et al., *XIAP-targeting drugs re-sensitize PIK3CA-mutated colorectal cancer cells for death receptor-induced apoptosis*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1570.
184. Kim, Y.S., et al., *TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death*. Mol Cell, 2007. **26**(5): p. 675-87.
185. Schenk, B. and S. Fulda, *Reactive oxygen species regulate Smac mimetic/TNFalpha-induced necroptotic signaling and cell death*. Oncogene, 2015. **34**(47): p. 5796-806.
186. Tait, S.W., et al., *Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis*. Cell Rep, 2013. **5**(4): p. 878-85.

187. Vercammen, D., et al., *Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1998. **187**(9): p. 1477-85.
188. Bittner, S., G. Knoll, and M. Ehrenschwender, *Death receptor 3 mediates necroptotic cell death*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(3): p. 543-554.
189. Strauss, L., et al., *Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 320-9.
190. Battaglia, M., et al., *Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8338-47.
191. Battaglia, M., A. Stabilini, and M.G. Roncarolo, *Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4743-8.
192. Rossetti, M., et al., *Ex vivo-expanded but not in vitro-induced human regulatory T cells are candidates for cell therapy in autoimmune diseases thanks to stable demethylation of the FOXP3 regulatory T cell-specific demethylated region*. J Immunol, 2015. **194**(1): p. 113-24.
193. Hoffmann, P., et al., *Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation*. Eur J Immunol, 2009. **39**(4): p. 1088-97.
194. Rauert, H., et al., *Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2)*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7394-404.
195. Wicovsky, A., et al., *TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling*. Cell Death Differ, 2009. **16**(11): p. 1445-59.
196. Schreiber, T.H., et al., *T cell costimulation by TNFR superfamily (TNFRSF)4 and TNFRSF25 in the context of vaccination*. J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3311-8.
197. Wang, E.C., et al., *Genomic structure, expression, and chromosome mapping of the mouse homologue for the WSL-1 (DR3, Apo3, TRAMP, LARD, TR3, TNFRSF12) gene*. Immunogenetics, 2001. **53**(1): p. 59-63.
198. Salzmann, S., et al., *Fibroblast growth factor inducible (Fn14)-specific antibodies concomitantly display signaling pathway-specific agonistic and antagonistic activity*. J Biol Chem, 2013. **288**(19): p. 13455-66.
199. Huang, D.C., et al., *Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 14871-6.

- 
200. Li, F. and J.V. Ravetch, *Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies*. Science, 2011. **333**(6045): p. 1030-4.
201. Li, F. and J.V. Ravetch, *Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fcγ receptor engagement*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(27): p. 10966-71.
202. Schneider, P., et al., *TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1*. Eur J Immunol, 1999. **29**(6): p. 1785-92.
203. Biener-Ramanujan, E., et al., *Functional signaling of membrane-bound TL1A induces IFN-γ expression*. FEBS Lett, 2010. **584**(11): p. 2376-80.
204. Jin, S., et al., *TL1A/TNFSF15 directly induces proinflammatory cytokines, including TNFα, from CD3+CD161+ T cells to exacerbate gut inflammation*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(5): p. 886-99.
205. Bossen, C., et al., *Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 13964-71.
206. Fotin-Mleczek, M., et al., *Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 13): p. 2757-70.
207. Linkermann, A., et al., *Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(11): p. 759-67.
208. Linkermann, A. and D.R. Green, *Necroptosis*. N Engl J Med, 2014. **370**(5): p. 455-65.
209. Burne, M.J., et al., *IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(2): p. 192-8.
210. Marshall, K.D. and C.P. Baines, *Necroptosis: is there a role for mitochondria?* Front Physiol, 2014. **5**: p. 323.
211. Ardestani, S., D.L. Deskins, and P.P. Young, *Membrane TNF-α-activated programmed necrosis is mediated by Ceramide-induced reactive oxygen species*. J Mol Signal, 2013. **8**(1): p. 12.
212. Temkin, V., et al., *Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(6): p. 2215-25.
213. Al-Lamki, R.S., et al., *Expression of silencer of death domains and death-receptor-3 in normal human kidney and in rejecting renal transplants*. Am J Pathol, 2003. **163**(2): p. 401-11.

- 214. Ko, G.J., et al., *Blocking Fas ligand on leukocytes attenuates kidney ischemia-reperfusion injury*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(4): p. 732-42.
- 215. Petersen, S.L., et al., *TRAF2 is a biologically important necroptosis suppressor*. Cell Death Differ, 2015. **22**(11): p. 1846-57.
- 216. Karl, I., et al., *TRAF2 inhibits TRAIL- and CD95L-induced apoptosis and necroptosis*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1444.
- 217. Croft, M., *The TNF family in T cell differentiation and function--unanswered questions and future directions*. Semin Immunol, 2014. **26**(3): p. 183-90.
- 218. Facciabene, A., G.T. Motz, and G. Coukos, *T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis*. Cancer Res, 2012. **72**(9): p. 2162-71.
- 219. Torrey, H., et al., *Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs*. Sci Signal, 2017. **10**(462).

## **7. Anhang**

### **7.1 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1. Schema zum Aufbau des primärem TNFR1 Signalkomplex (Komplex I) .....	13
Abbildung 2. Übersicht zu TNFR1-induziertem Zelltod. ....	17
Abbildung 3. Zelltod-Induktion und NFkB-Aktivierung durch lösliches TL1A und TNF. ....	43
Abbildung 4. Zelltod-Induktion und NFkB Aktivierung sind unabhängig von autokriner TNF Sekretion.....	45
Abbildung 5. Oligomerisierung von löslichem TL1A hat keinen Effekt auf DR3-Signaltransduktion.....	48
Abbildung 6. TL1A Bindungsstudie .....	50
Abbildung 7. IAP-Depletion verstärkt DR3-induzierten Zelltod. ....	53
Abbildung 8. DR3-induziert Caspase-unabhängigen Zelltod. ....	56
Abbildung 9. TL1A induziert die Formation des Nekrosoms.....	59
Abbildung 10. DR3-induzierte Nekroptose ist abhängig von HSP90 und RIP3. ....	61
Abbildung 11. TAK1 reguliert DR3-induzierten Zelltod.....	65
Abbildung 12. DR3-vermittelte Nekroptose wird von ROS Produktion begleitet. ....	67
Abbildung 13. Charakterisierung expandierter Tregs. ....	70
Abbildung 14. DR3 aktiviert intrazelluläre Signalwege in humanen Tregs. ....	72
Abbildung 15. DR3-Signaltransduktion steigert Treg Proliferation <i>ex vivo</i> .....	75

### **7.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1. Für Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.....	32
Tabelle 2. Rezeptur eines SDS-Polyacrylamidgels .....	38
Tabelle 3. Für Westernblot verwendete Antikörper.....	39

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

Symbole		
	$\alpha$ -	anti
	$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
A	A	Ampere
	aa	Aminosäuren
	APC	Allophycocyanin
B	BSA	bovine serum albumin
C	CD	cluster of differentiation
	cFLIP	cellular FILCE-like inhibitory protein
	cIAP1/2	cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2
	CRD	cysteine rich domain
D	DD	death domain
	DR3	Death Receptor 3
	DISC	death inducing signalling complex
	DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
	DMEM	DULBECCO'S minimal essential medium
	DNA	deoxyribonucleic acid
E	ECL	enhanced chemiluminescence
	EDTA	Ethylendiamin-N-N,N',N'-tetraacetat
	ERK	extracellular signal regulated kinase
	<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i>
F	FADD	fas associated death domain protein
	FITC	Fluorescein-isothiocyanat
	FKS	Fötales Kalb Serum
G	g	mittlere Erdbeschleunigung
	GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
	GFP	green fluorescent protein
	G-MCSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
	GpL	Gaussia princeps luciferase
H	HRP	horseradish peroxidase
I	i.d.R.	In der Regel
	IgG	Immunglobulin G
	IFN	Interferon
	I $\kappa$ B $\alpha$	inhibitor of NF $\kappa$ B $\alpha$
J	JNK	c-Jun N-terminal kinase
K	kD	kilo Dalton

L	LPS	Lipopolysaccharid
	LUBAC	linear ubiquitin assembly complex
M	M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
	MHC	major histocompatibility complex
	min	Minute
	ml	Milliliter
	MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein
N	Nec-1	Necrostatin-1
	NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
	ng	Nanogramm ( $10^{-9}$ )
	NSA	Necrosulfonamid
O	OD <sub>595</sub>	optical density, Wellenlänge $\lambda = 595$ nm
P	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
	PAMP	pathogen-associated molecular patterns
	PBMC	peripheral blood mononuclear cell
	PBS	Phosphate buffered saline
	PE	Phycoerythrin
	PRR	pattern recognition receptor
R	RIP1/RIP3	receptor interacting protein 1/3
	ROS	reactive oxygen species
	RT	Raumtemperatur
S	SDS	Sodium dodecyl sulfate
	SEM	standard error of the mean
	SM	SMAC Mimetika
T	TAK1	transforming growth factor-beta-activated kinase 1
	TBS	Tris Buffered Saline
	TBS-T	Tris Buffered Saline-Tween
	Th	T-Helferzelle
	TL1A	Tumor Nekrose Faktor-like Ligand A
	TLR	Toll-like Rezeptor
	TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
	TNFR1/2	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1/2
	TRADD	TNF receptor associated death domain
	TRAF2	TNF receptor associated factor 2
	Treg	regulatorische T-Zelle
V	V	Volt



## 7.4 Publikationen

Bittner S, Knoll G, Ehrenschwender M

**Death receptor 3 mediates necroptotic cell death**

M. Cell. Mol. Life Sci. (2017) 74: 543. doi:10.1007/s00018-016-2355-2

Knoll G, Bittner S, Kurz M, Jantsch J, Ehrenschwender M

**Hypoxia regulates TRAIL sensitivity of colorectal cancer cells through mitochondrial autophagy**

Oncotarget. 2016 May. doi: 10.18632/oncotarget.9206.

Bittner S, Knoll G, Füllsack S, Kurz M, Wajant H, Ehrenschwender M

**Soluble TL1A is sufficient for activation of death receptor 3**

FEBS J. 2016 Jan; doi: 10.1111/febs.13576

Ehrenschwender M, Bittner S, Seibold K, Wajant H

**XIAP-targeting drugs re-sensitize PIK3CA-mutated colorectal cancer cells for death receptor-induced apoptosis**

Cell Death Dis. 2014 Dec; doi: 10.1038/cddis.2014.534.

## 7.5 Auszeichnungen

FEBS Journal Richard Perham Preis 2017, für die Publikation “Soluble TL1A is sufficient for activation of death receptor 3”

Posterpreis auf der Konferenz der International Cell Death Society 2016 in Cork (Irland) für das Poster „Molecular Mechanisms of Death Receptor 3 Signaling“

Finalteilnahme am 2nd pRED ROCHE Oncology Award 2014 mit dem Vortrag „Death Receptor Signaling hijacked: XIAP at the crossroads of tumor promotion and tumor surveillance in PIK3CA-mutated colorectal cancer“

## 7.6 Lebenslauf

### Persönliche Informationen

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsort: Roth

Geburtsdatum: 30.09.1987

### Schulbildung und Studium

<u>Januar 2014</u>	Beginn der Promotion am Universitätsklinikum Regensburg, Institut für Mikrobiologie und Hygiene	Einreichen der Dissertation "Death Receptor 3-Molekulare Mechanismen der Rezeptoraktivierung und der intrazellulären Signaltransduktion" am 24.02.2017
<u>Oktober 2011 bis Oktober 2013</u>	Master of Science Universität Regensburg	Masterarbeit „Die Rolle TNFR1 assoziiierter Ubiquitin Ligasen zur Lokalisation von <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ins Autophagosom“ bei Herr PD. Dr. Schneider-Brachert und Herr Prof. Dr. Warth
<u>Oktober 2008 bis August 2011</u>	Bachelor of Science Universität Regensburg	Bachelorarbeit „Die Polo-Kinase Cdc5 im Spindelkontrollsystem“ am Lehrstuhl für Genetik bei Herr Prof.Dr. Seufert
<u>Oktober 2007 bis Juni 2008</u>	Wehrdienst	Luftwaffenausbildungsregiment 5
<u>1998-2007</u>	schulische Ausbildung	Abitur am Gymnasium Roth

## 7.7 Danksagung

Meine Danksagung gilt allen die mich während meiner Arbeit unterstützt haben, vor allem aber meiner Familie und Freundin.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Dr. André Gessner für die motivierende Betreuung und hilfreichen Ratschläge zu dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dr. Martin Ehrenschwender für die engagierte, kompetente und geduldige Betreuung meiner Arbeit. Bei ihm und bei Kristina Seibold, Maria Kurz, Gertrud Knoll und Simon Sirtl bedanke ich mich für eine unvergessliche Zeit im Labor.

Herrn Prof. Dr. Richard Warth danke ich für die freundliche Bereiterklärung diese Arbeit als Mentor zu betreuen.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Mentor Herrn. Prof. Dr. Wajant für Ideen, Verbesserungsvorschläge zu dieser Arbeit und natürlich für die die TL1A-Expressionsplasmide bedanken.